



Márcia Filipa Bouça Alves

Licenciatura em Ciências da Engenharia Química e Bioquímica

Ensaio de Eficácia de Conservantes

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em

Engenharia Química e Bioquímica

Orientadora: Eng^a Isabel Costa, Grupo Medinfar

Co-orientador: Prof. Mário Eusébio, FCT-UNL

Júri:

Presidente: Prof. Dr^a Maria Madalena Alves Campos de Sousa Dionísio Andrade

Arguente: Prof. Dr^a Paula Maria Theriaga Mendes Gonçalves

Vogal: Eng^a Isabel Margarida Mendes Costa

Márcia Filipa Bouça Alves

Licenciatura em Ciências da Engenharia Química e Bioquímica

Ensaio de Eficácia de Conservantes

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em

Engenharia Química e Bioquímica

Orientadora: Eng^a Isabel Costa, Grupo Medinfar

Co-orientador: Prof. Dr. Mário Eusébio, FCT-UNL

UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

Faculdade de Ciências e Tecnologias

Departamento de Química

Setembro 2018

Copyright © Márcia Filipa Bouça Alves, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa.

A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

Agradecimentos

Não podia deixar de agradecer a todas as pessoas que fizeram parte desta última etapa do meu percurso académico.

Primeiramente, queria agradecer aos meus pais por todo o esforço que fizeram para que pudesse formar-me. Para além disso foram as pessoas que sempre me apoiaram e ajudaram a superar todas as dificuldades sentidas ao longo do curso.

Um grande obrigado à minha irmã, ao meu cunhado e ao meu sobrinho por estarem sempre presentes nesta fase.

Agradeço especialmente ao meu namorado Gonçalo por todos os conselhos, palavras de apoio e de incentivo para que eu desse o máximo de mim nesta etapa. Foi sem dúvida o meu grande pilar.

A todos os meus amigos da faculdade, principalmente a Soraia, a Inês Rainho, a Ana, o Diogo e o Francisco que tornaram estes anos de faculdade os melhores que já vivi até hoje. Um obrigado especial à Ana Rita, que para além de ser minha colega de faculdade, foi minha colega de estágio na Medinfar, tendo sido o meu principal apoio.

Queria deixar um agradecimento especial à Joana e à Nélia, que foram as pessoas que me ensinaram tudo o que sei hoje sobre microbiologia. Foram pessoas incansáveis, das quais vou guardar um carinho muito especial.

Um muito obrigado à minha orientadora Isabel Costa, que para além de ter sido um apoio fundamental na elaboração da minha dissertação, foi a pessoa que me deu os melhores conselhos que irei levá-los comigo para a minha vida profissional.

Um grande obrigado à Sónia, que conheci na Medinfar, foi das melhores pessoas que podia ter conhecido e que tornou esta etapa inesquecível.

Aos estagiários Rafael e Bruno que me acompanharam durante o meu estágio e que estiveram sempre presentes nos bons momentos que vivi nesta etapa.

À restante equipa do I&D da Medinfar, principalmente a Margarida, a Susana, a Ana Margarida, a Aninhas, a Mariana, o Jorge, a Isabel e a Cristina, um obrigado pela forma como me acolheram na empresa.

Por fim, gostaria de agradecer ao professor Mário Eusébio pela oportunidade que me deu em realizar o meu estágio na Medinfar e por todas as sugestões que me deu que me permitiram melhorar o meu trabalho.

Resumo

O Ensaio de Eficácia de Conservantes é um teste microbiológico necessário para garantir que os produtos farmacêuticos e cosméticos se mantêm seguros e estáveis para uso, a nível microbiológico. Existem diferentes protocolos que descrevem este ensaio, nomeadamente, as farmacopeias e a norma ISO 11930, específicos para medicamentos e cosméticos, respetivamente. No entanto, estes não se encontram harmonizados em relação aos requisitos do ensaio.

Esta dissertação teve como primeiro foco a compilação das principais diferenças na metodologia do ensaio para medicamentos e cosméticos. Posteriormente, essas diferenças foram aplicadas, diretamente, na análise de diferentes tipos de produtos.

Todos os medicamentos analisados cumprem com os critérios de aceitação definidos pela farmacopeia europeia, à exceção da pomada de óxido de zinco. Enquanto que os cosméticos cumprem com os critérios estabelecidos pela norma ISO 11930.

Um dos medicamentos analisados, o Ibuprofeno suspensão oral, encontra-se em desenvolvimento, pelo que foi submetido a testes para determinar a concentração mínima eficaz de conservante. Os resultados demonstram que a partir da concentração de 80% de benzoato de sódio, relativamente ao valor pretendido, o conservante é considerado eficaz. A fim de comprovar a suspeita de que a própria substância ativa apresenta propriedades antimicrobianas, este produto foi formulado com diferentes concentrações de Ibuprofeno e foram posteriormente submetidas ao ensaio. Os resultados obtidos revelam que Ibuprofeno tem algum efeito inibitório contra os microrganismos *C.albicans* e *A.brasiliensis*; e tem uma forte ação antibacteriana, uma vez não houve nenhuma recuperação das bactérias *E.coli*, *P. aeruginosa* e *S. aureus*.

Paralelamente, foram testadas novas formas para homogeneizar e diluir produtos mais espessos, como cremes e emulsões. Conclui-se que nas melhores tentativas, para o creme muda fraldas é a adição de 1% de polissorbato 80 e utilização do fluido Eugon suplementado com 5% de polissorbato 80; e para a pomada de óxido de zinco é a adição de 10% de miristato de isopropilo e utilização do fluido Eugon.

Por fim, submeteu-se o mesmo produto 3 vezes ao ensaio. Os resultados obtidos foram idênticos pelo que se comprova a reprodutibilidade deste ensaio.

Palavras chave: Eficácia; Conservantes; Microrganismos

Abstract

The Preservative Efficacy Test is a microbiological test necessary to ensure that pharmaceuticals and cosmetics products remain safe and stable for use, at the microbial level. There are different protocols describing this test, namely pharmacopoeias and ISO 11930, specific for medicines and cosmetics, respectively. However, they are not harmonized with the requirements of the test.

This dissertation had as first focus the compilation of the main differences in the methodology of the test for medicines and cosmetics. Subsequently, these differences were applied directly in the analysis of different types of products.

All the medicines comply with the acceptance criteria defined by the European pharmacopoeia, with the exception of zinc oxid ointment. While cosmetic meet the criteria established by ISO 11930.

One of the drugs tested, Ibuprofen oral suspension, is under development, and has therefore been subjected to the test to determine the minimum effective preservative concentration required. The results showed that from the 80% concentration of sodium benzoate, relative to the desired value, the preservative is considered to be effective. In order to confirm the suspicion that the active substance itself has antimicrobial properties, this product was further formulated with different concentrations of Ibuprofen and were subsequently submitted to the test. The results obtained show that Ibuprofen has some inhibitory effect against the microorganisms *C. albicans* and *A. brasiliensis*; and has a strong antibacterial action, because there was no recovery of bacteria *E. coli*, *P. aeruginosa* and *S. aureus*.

In parallel, new ways were tested to homogenize and dilute thicker products, such as creams and emulsions. It is concluded that in the best options, for the cream changes diapers, is the addition of 1% of polysorbate 80 and use of eugon fluid supplemented with 5% of polysorbate 80; and for the zinc oxide ointment, is the addition of 10% of isopropyl myristate and use of eugon fluid.

Finally, the same product was subjected 3 times to the assay. The results obtained were identical, so the reproducibility of this assay is proven.

Keywords: Efficacy; Preservative; Microorganism

Índice

1. Enquadramento e motivação do trabalho	1
2. Introdução.....	5
2.1. Contaminação microbiológica	5
2.2. Conservantes	6
2.3. Ensaio de Eficácia de Conservantes (EEC).....	9
2.3.1. Ensaio de eficácia de conservantes em medicamentos e suplementos alimentares: comparação entre farmacopeias	12
2.3.2. Ensaio de eficácia de conservantes em cosméticos	19
2.3.3. Método alternativo ao ensaio de eficácia de conservantes	22
2.3.4. Métodos de quantificação do número de células viáveis.....	22
2.4. Demonstração da eficácia de neutralização- validação	25
2.5. Efeito das características dos produtos no Ensaio de Eficácia de Conservantes ..	28
3. Materiais e Métodos	33
3.1. Produtos.....	33
3.2. Estirpes de microrganismos	34
3.3. Reagentes	35
3.4. Metodologia dos Ensaos de Eficácia de Conservantes.....	36
4. Discussão de resultados.....	43
4.1. Análise da eficácia de diferentes concentrações de conservante no produto ibuprofeno suspensão oral	43
4.2. Análise da ação antimicrobiana do ibuprofeno suspensão oral com diferentes concentrações de ibuprofeno	48
4.3. Análise da eficácia antimicrobiana do shampoo anti queda de cabelo	49
4.4. Análise da eficácia antimicrobiana do suplemento vitamínico	52
4.5. Análise da eficácia antimicrobiana da solução oral de paracetamol.....	54
4.6. Análise da eficácia antimicrobiana do creme muda fraldas	55
4.7. Análise da eficácia antimicrobiana da pomada de Óxido de Zinco	57

4.8. Análise da variabilidade e reprodutibilidade do Ensaio de Eficácia de Conservantes	61
5. Conclusões e propostas de trabalho futuro.....	65
Referências bibliográficas	67
ANEXOS.....	75
Anexo A: Resultados das contagens de microrganismos obtidas nas validações dos produtos.....	76

Índice de Figuras

Figura 2.1- Redução da concentração de conservante ao longo do tempo	11
Figura 2.2- Etapas do ensaio de eficácia de conservantes.....	12
Figura 2.3- Método da filtração por membrana	23
Figura 2.4- Método de incorporação	24
Figura 2.5- Método de espalhamento	25
Figura 3.1- Diagrama de decisão da validação do método de neutralização.	36
Figura 3.2- Testes efetuados para tentar homogeneizar a pomada de Óxido de Zinco	39
Figura 3.3- Etapas do Ensaio de Eficácia de Conservantes para medicamentos e cosméticos	40
Figura 3.4- Etapas realizadas na filtração por membrana	41
Figura 3.5- Tempos de amostragem segundo o tipo de formulação do produto	42
Figura 4.1- Resultado da recuperação microbiana no ibuprofeno com concentração de 100% conservante testando:(a) diluição 1:10 em Eugon;(b) diluição 1:100 em Eugon	44
Figura 4.2- Resultado da recuperação microbiana no ibuprofeno com concentração de 50% conservante testando:(a) diluição 1:10 em Eugon;(b) diluição 1:100 em Eugon	45
Figura 4.3- Resultado da recuperação microbiana no ibuprofeno com concentração de 80% conservante testando a diluição 1:100 em Eugon	45
Figura 4.4- Resultado da recuperação microbiana no ibuprofeno com concentração de 90% de conservante testando a diluição 1:100 em Eugon	46
Figura 4.5- Resultado da recuperação microbiana no shampoo com 20% de álcool testando: (a) diluição 1:100 em Eugon; (b) diluição 1:1000 em Eugon	50
Figura 4.6- Resultado da recuperação microbiana no shampoo com 10% álcool testando a diluição 1:100 em eugon	50
Figura 4.7- Resultado da recuperação microbiana no suplemento vitamínico testando a diluição 1:10 em APT	53
Figura 4.8- Resultado da recuperação microbiana na solução oral de paracetamol testando a diluição 1:10 em Eugon.....	54
Figura 4.9- Resultado da recuperação microbiana no creme muda fraldas testando: (a) diluição 1:10 em Eugon; (b) diluição 1:100 em Eugon	57
Figura 4.10- Resultado da recuperação microbiana na pomada de óxido de zinco testando a diluição 1:100 em Eugon com a adição do miristato de isopropilo	59
Figura 4.11- Diagrama Causa-Efeito referente ao Ensaio de Eficácia de Conservante.....	62

Índice de Tabelas

Tabela 2.1- Condições ótimas de crescimento dos microrganismos.....	5
Tabela 2.2- Conservantes comuns na indústria farmacêutica	7
Tabela 2.3- Concentrações típicas dos conservantes comuns na indústria farmacêutica	10
Tabela 2.4- Categorias de produtos segundo as farmacopeias	13
Tabela 2.5 - Microrganismos padrão utilizados por cada farmacopeia.....	13
Tabela 2.6- Preparação do inóculo segundo as farmacopeias	14
Tabela 2.7- Requisitos das farmacopeias para o Ensaio de Eficácia de Conservantes	15
Tabela 2.8- Meios de cultura e condições de incubação dos microrganismos segundo as farmacopeias	16
Tabela 2.9- Critérios de aceitação da Farmacopeia Japonesa	17
Tabela 2.10- Comparação entre os critérios de aceitação das farmacopeias EP e USP	18
Tabela 2.11- Microrganismos padrão sugeridos pela ISO 11930 e pela CTFA	20
Tabela 2.12- Requisitos para a realização do Ensaio de Eficácia de Conservantes segundo a norma ISO 11930 e as diretrizes da CTFA.....	20
Tabela 2.13- Meios de cultura e condições de incubação recomendados pela ISO e CTFA.....	21
Tabela 2.14- Comparação entre os critérios de aceitação segundo a norma ISO 11930 e as diretrizes da CFTA.....	21
Tabela 2.15- Métodos de neutralização mais adequados para determinados agentes antimicrobianos	27
Tabela 2.16- Valores de Atividade de água (a_w) necessários para suportar o crescimento de diferentes microrganismos	29
Tabela 2.17- Exemplos de produtos de baixo risco microbiológico	31
Tabela 3.1- Informações sobre os produtos submetidos aos Ensaios de Eficácia de Conservantes	33
Tabela 3.2- Estirpes de microrganismos utilizados nos Ensaios de Eficácia de Conservantes ...	34
Tabela 3.3- Reagentes utilizados para preparação dos meios de cultura, soluções e agentes emulsionantes.....	35
Tabela 3.4- Preparação das suspensões microbianas para o teste de validação	37
Tabela 4.1- Resultados do Ensaio de Eficácia de Conservantes ao longo dos 28 dias para o Ibuprofeno suspensão oral com diferentes percentagens de conservante.....	46
Tabela 4.2- Resultados das reduções logarítmicas para o ibuprofeno com diferentes concentrações de conservante	47

Tabela 4.3- Resultados do Ensaio de Eficácia de Conservantes ao longo dos 28 dias para o Ibuprofeno suspensão oral com diferentes quantidades de ibuprofeno	48
Tabela 4.4- Resultados do Ensaio de Eficácia de Conservantes ao longo dos 28 dias para as duas formulações do shampoo com 10% e 20% de álcool.....	51
Tabela 4.5- Resultados das reduções logarítmicas para as duas formulações do shampoo com 10% e 20% de álcool.....	51
Tabela 4.6- Resultados do Ensaio de Eficácia de Conservantes ao longo dos 28 dias para o suplemento vitamínico	53
Tabela 4.7- Resultados das reduções logarítmicas para o suplemento vitamínico	53
Tabela 4.8- Resultados do Ensaio de Eficácia de Conservantes ao longo dos 28 dias para a solução oral de paracetamol	54
Tabela 4.9- Resultados das reduções logarítmicas para a solução oral de paracetamol	55
Tabela 4.10- Formas para homogeneizar e dissolver o creme muda fraldas antes da validação do método de neutralização	56
Tabela 4.11- Resultados do EEC ao longo dos 28 dias para o creme muda fraldas	58
Tabela 4.12- Resultados das reduções logarítmicas para o creme muda fraldas	58
Tabela 4.13- Diferentes formas para facilitar a homogeneização da pomada de óxido de zinco	59
Tabela 4.14- Resultados do EEC ao longo dos 28 dias para a pomada de óxido de zinco	60
Tabela 4.15- Resultados das reduções logarítmicas para a pomada de óxido de zinco	60
Tabela 4.16- Resultados do EEC ao longo dos 28 dias para o medicamento para a tosse (3 amostras).....	63
Tabela 4.17- Resultados das reduções logarítmicas para o medicamento para a tosse (3 amostras).....	64

Lista de Siglas e Acrónimos

API- *Active Pharmaceutical Ingredient*

APT- Água peptonada

BPF- Boas Práticas de Fabrico

CFL- Câmara de Fluxo Laminar

CMI- Concentração Mínima Inibitória

DEB- *Dey-Engley Broth*

EEC- Ensaio de Eficácia de Conservantes

EDTA- *Ethylene diamine tetraacetic acid*

EP- *European Pharmacopoeia*

GPA- *Glucose Peptone Agar*

ISO- *International Organization for Standardization*

JP- *Japanese Pharmacopoeia*

PDA- *Potato Dextrose Agar*

PV- Prazo de validade

PUV- Produtos de uso veterinário

SDA- *Sabouraud Dextrose Agar*

TR- Taxa de recuperação

TSA- *Trypticase Soy Agar*

Ufc- Unidades formadoras de colónias

USP- *United States Pharmacopoeia*

1. Enquadramento e motivação do trabalho

A não contaminação microbiológica é uma preocupação constante em várias indústrias, nomeadamente, na indústria farmacêutica e na cosmética. Os fabricantes de produtos farmacêuticos devem ter em conta que, ao lançarem os seus produtos no mercado, estes podem ser suscetíveis de contaminações, quando expostos a condições de armazenamento e utilização não adequadas. Os produtos mais problemáticos são os que contêm água na sua composição, tais como, suspensões e soluções orais, por serem ambientes mais propícios para o crescimento e proliferação de microrganismos. No entanto, é aceitável que estes produtos tenham na sua composição microrganismos, desde que não ultrapassem os limites microbianos estabelecidos legalmente.

Frequentemente existe a necessidade de recorrer à inclusão de conservantes antimicrobianos na formulação do produto, para inibir o crescimento de microrganismos, que podem ser introduzidos em várias fases da vida do produto: podem encontrar-se nas matérias-primas utilizadas, durante e após o processo de fabrico e libertação do lote. Contudo, os agentes antimicrobianos não devem ser utilizados como substitutos das boas práticas de fabrico (BPF) [1]. Pelo contrário, as empresas adotam as BPF, uma vez que ajudam a evitar possíveis contaminações durante o processo de produção [2].

Normalmente os conservantes antimicrobianos são substâncias, que em quantidade excessiva, poderão ser tóxicas. Estes são adicionados a produtos com o intuito de os proteger, por isso devem ser adicionados em pequena quantidade [3]. A União Europeia estabelece regras de utilização destas substâncias. No anexo V do regulamento 1223/2009 da União Europeia, encontram-se listados os conservantes aprovados para uso, assim como as suas concentrações máximas permitidas, restrições e condições de utilização [4].

Estes agentes antimicrobianos têm de ser eficazes até ao final do prazo de validade do produto [5]. Por isso, o produto é submetido a Ensaio de Eficácia de Conservantes (EEC), a fim de garantir que estes se mantêm seguros e estáveis para uso, a nível microbiano. Em determinadas ocasiões e quando não se conhece as características do conservante, é realizado um teste de determinação da concentração mínima inibitória (CMI). A CMI é a concentração mínima de conservante necessário para inibir o crescimento de um microrganismo específico [6, 7]. No entanto, a eficácia dessa concentração de conservante, só é comprovada através da realização de Ensaio de Eficácia de Conservantes realizados no desenvolvimento galénico, onde se avalia a resistência da formulação final do produto à contaminação microbiana. Na fase de desenvolvimento galénico, o produto é formulado com diversas concentrações de conservante de modo a estudar a concentração mínima eficaz de conservante [8]. Nesta fase tem-se em conta que atividade antimicrobiana

dos conservantes é influenciada pelas características físicas e químicas do produto, nomeadamente, pelo pH, atividade da água, teor de álcool e pela interação com outras substâncias presentes na formulação, que podem também possuir propriedades antimicrobianas [9, 10].

A metodologia e os requisitos do Ensaio de Eficácia de Conservantes encontram-se descritos nos capítulos das diferentes farmacopeias (Europeia, Americana e Japonesa) e pela norma ISO 11930 (Organização Internacional da Normalização). Estas diretrizes seguem o mesmo princípio, a contaminação controlada do produto com elevadas cargas microbianas conhecidas e o acompanhamento do número de microrganismos sobreviventes ao longo de um período de cerca de 1 mês [11]. Contudo, existem ligeiras diferenças entre as várias diretrizes.

A Medinfar comercializa medicamentos para uso humano e veterinário, suplementos alimentares, produtos de uso veterinário (PUV) e cosméticos maioritariamente para a União Europeia. Por isso a eficácia antimicrobiana dos produtos farmacêuticos, suplementos e produtos de uso veterinário é analisada segundo o capítulo 5.1.3. da farmacopeia europeia (EP). No caso dos produtos cosméticos, estes são analisados de acordo com o procedimento e os requisitos da norma ISO 11930. Esta norma foi estabelecida especificamente para cosméticos.

A ampliação da escala laboratorial para a escala industrial (*scale-up*), pode alterar o desempenho da atividade antimicrobiana ou a estabilidade do conservante numa determinada formulação. Por isso, o Ensaio de Eficácia de Conservantes também é realizado em lotes de escala industrial, para confirmar a eficácia do sistema conservante, assim como a sua compatibilidade com a embalagem final onde se armazena o produto [12].

A fase de estabilidade do produto é um ponto importante para detetar possíveis problemas de redução de concentração do conservante, nomeadamente por degradação ou adsorção do mesmo, pelo material de acondicionamento, ao longo do tempo. Por isso nesta fase, o EEC é realizado no início e no final do prazo de validade do produto, para garantir que no final do prazo, o produto mantém a quantidade mínima necessária de conservante para manter a eficácia antimicrobiana.

Este trabalho tem como principal objetivo, avaliar a eficácia de conservantes em diferentes tipos de produtos farmacêuticos, suplementos e cosméticos, sobretudo, líquidos e cremes. Previamente serão comparadas as diferentes formas de execução dos EEC descritas pelas farmacopeias e pela norma ISO 11930.

Uma das fases dos ensaios de eficácia de conservantes passa pela seleção do melhor neutralizante e da diluição mais adequada a cada tipo de formulação, que permita detetar os microrganismos existentes, realizando um teste de validação, antecipadamente, do EEC. Esta fase é crucial, uma vez que permite reunir as condições necessárias para obter resultados credíveis.

Paralelamente pretende-se determinar a quantidade mínima eficaz de conservante numa nova formulação. Para isso é realizado o ensaio de eficácia, testando diferentes percentagens de concentração do conservante, desde a ausência total de conservante até ao máximo permitido, com o intuito de descobrir a quantidade mínima eficaz de conservante no novo produto formulado. No

seguimento deste trabalho suspeitou-se que o API (*Active Pharmaceutical Ingredient*) deste produto possui alguma atividade antimicrobiana, e por isso outro objetivo será avaliar qual é a concentração mínima de API capaz de inibir o crescimento microbiano. Para isso o produto é formulado com diferentes concentrações de API e sem a adição de conservantes e testado em termos de EEC.

Numa fase final pretende-se comprovar que o Ensaio de Eficácia de Conservantes é ainda reprodutível.

2. Introdução

2.1. Contaminação microbiológica

A água, o ar e a presença de nutrientes são os três requisitos básicos essenciais para o crescimento microbiológico [13].

As contaminações microbiológicas são causadas por microrganismos, tais como bactérias, leveduras e fungos, que podem ser detetados em diversos produtos existentes no mercado, nomeadamente, medicamentos, suplementos alimentares, produtos de uso veterinário e cosméticos.

Cada um dos microrganismos possuem diferentes condições de crescimento, e como tal é necessário ter em conta os fatores que mais influenciam o seu desenvolvimento, nomeadamente, a temperatura, o pH, atividade da água e a presença de oxigénio (em alguns microrganismos) e de certos nutrientes. As indústrias farmacêuticas, ao conhecer o efeito destes parâmetros nos microrganismos, tentam manipular, sempre que possível, as formulações de forma a criar condições desfavoráveis ao seu crescimento [14]. Na tabela 2.1 é feita a comparação das condições favoráveis ao crescimento dos diferentes microrganismos.

Grande parte dos produtos farmacêuticos são propícios à contaminação microbiana, uma vez que podem ser produtos que contêm água na sua composição, tais como, suspensões, soluções,

Tabela 2.1- Condições ótimas de crescimento dos microrganismos [15, 16]

	Bactérias	Leveduras	Fungos
Temperatura ótima de crescimento (°C)	25-37	25-30	20-30
Nutrientes	Proteínas; Aminoácidos; Alimentos à base de animais	Açúcares; Alimentos à base de plantas	Amido; Alimentos à base de plantas
pH ótimo de crescimento	5,5-8,5	4,0-6,0	
Aeróbico/anaeróbico	Maioritariamente aeróbicas, mas algumas anaeróbicas	Aeróbicas e anaeróbicas	Aeróbicos
Espécies típicas	<i>Escherichia coli</i> ; <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ; <i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Candida albicans</i>	<i>Aspergillus brasiliensis</i>

cremes, emulsões e géis, produtos com açúcares e adoçantes e/ou produtos embalados em frascos de dose múltipla [17].

Estes produtos, ao estarem sujeitos a contaminações microbiológicas, podem representar um risco para a saúde dos consumidores ou causar a sua degradação. As contaminações podem ter origem nas matérias-primas (particularmente a água) e excipientes ou podem ser introduzidas durante o processo de fabrico (através dos operadores, equipamentos, meio ambiente e materiais de embalagem), posterior armazenamento e uso. Com o intuito de evitar estas contaminações durante todo o processo de fabrico, as empresas seguem as boas práticas de fabrico (BPF) [2].

O controlo microbiológico é um ensaio que faz parte da análise do medicamento na libertação do mesmo para o mercado, assim como nos Ensaio de Estabilidades efetuados no produto para garantir que este não se encontra contaminado. Previamente, antes do fabrico do produto, as matérias-primas utilizadas são também controladas microbiologicamente e só são usadas caso estejam em conformidade, ou seja, dentro dos limites considerados aceitáveis.

No entanto, a indústria farmacêutica preocupa-se ainda com o posterior uso e armazenamento do produto por parte do consumidor, tendo por isso especial atenção ao design da embalagem, rotulagem e qualidade do produto até ao final do prazo de validade (PV) [18]. Por isso, são realizados Ensaio de Eficácia de Conservantes durante o processo de desenvolvimento galénico, no início e no final do PV do produto, ou ainda num tempo intermédio, quando se verifica um decréscimo acentuado das concentrações de conservantes ao longo do tempo. Estes ensaios permitem garantir a segurança e eficácia contra a contaminação microbiológica dos produtos ao longo de toda a vida útil dos mesmos.

Por isso, devido às consequências das contaminações microbiológicas, para além do controlo da qualidade das matérias-primas utilizadas no produto e da necessidade de garantir a qualidade da água utilizada como veículo no produto, é extremamente importante fazer [19]:

- O controlo ambiental, incluindo o do pessoal;
- Cumprir com os limites estipulados pelos diferentes países, para o número máximo de microrganismos permitidos nos produtos e substâncias;
- Seleção de embalagens e doseadores adequados;
- E ter em conta a necessidade de uma conservação adequada e realização dos testes de eficácia de conservantes acima referidos.

2.2. Conservantes

Entende-se por conservantes como substâncias naturais ou sintéticas, que têm como finalidade, principal ou exclusiva, inibir o desenvolvimento de microrganismos que podem surgir inadvertidamente numa ampla gama de produtos [2].

É importante salientar que os conservantes antimicrobianos não devem ser utilizados para disfarçar possíveis contaminações que possam ocorrer durante todo o seu processo de fabrico. As empresas farmacêuticas adotam procedimentos de higiene, limpeza e desinfecção de modo a assegurar a máxima proteção dos produtos dessas contaminações [1].

A escolha do tipo de conservante assim como a sua concentração para uma determinada formulação depende de vários fatores. O tipo de preparação, a via de administração (especial atenção a produtos usados para os olhos, membranas mucosas e pele danificada) e a eficácia do sistema conservante requerida são os principais critérios de escolha. No entanto, outros aspetos são tidos em conta, como possíveis reações alérgicas e outros efeitos colaterais indesejados, interação com os restantes compostos da formulação [20], a resistência de certos microrganismos a conservantes comuns [21] e até o público alvo a que se destina (crianças ou adultos).

Existe uma extensa lista de conservantes permitidos a serem utilizados na indústria farmacêutica. Na tabela 2.2 estão representadas as diferentes classes químicas de conservantes assim como alguns exemplos de conservantes mais comuns em produtos farmacêuticos, medicamentos não sujeitos a receita médica (OTC), produtos cosméticos e de cuidado pessoal, consoante o seu tipo de aplicação.

Tabela 2.2- Conservantes comuns na indústria farmacêutica [22-25]

Conservante	Classe química	Aplicação típica
Metilparabeno Etilparabeno Propilparabeno Butilparabeno	Parabenos	Produtos de uso oral Cremes e emulsões
Clorohexidina	Biguanidas	Produtos de higiene oral Preparações oftálmicas e parenterais
Ácido benzoico Benzoato de sódio Sorbato de potássio	Ácidos e sais derivados	Produtos de uso oral (suspensões e soluções)
Timerosal	Compostos de mercúrio orgânico	Produtos de aplicação tópica
Álcool benzílico	Álcool	Produtos de uso oral Preparações parenterais
Cloreto de benzalcónico Cloreto de benzetónio	Compostos de amónio quaternários	Produtos de aplicação tópica

Geralmente, os microrganismos requerem água para o seu desenvolvimento, pelo que produtos como comprimidos e cápsulas, normalmente não necessitam de conservantes antimicrobianos.

Um conservante adequado deve ter determinadas propriedades e/ou características [26]:

1. Ser eficaz em baixas concentrações contra um amplo espectro de microrganismos;
2. Ser solúvel na formulação na concentração necessária;
3. Não ser tóxico nem sensível na concentração utilizada;
4. Ser compatível com os restantes componentes da formulação e materiais de embalagem;
5. Não ter nenhuma influência na cor, odor ou outras propriedades físicas da formulação;
6. Ser estável ao longo de amplas faixas de pH e temperatura;
7. Ter um custo relativamente baixo;
8. Estar de acordo com a legislação.

Na prática é difícil selecionar um conservante que cumpra todos os requisitos enumerados anteriormente [22]. E por isso, na produção de formulações mais complexas pode não ser suficiente a utilização de apenas um tipo de conservante, uma vez que esse conservante pode não ser totalmente eficaz na proteção do produto. Nestas situações usa-se uma combinação de conservantes que permite aumentar o espectro antimicrobiano; diminuir a quantidade necessária de conservantes individuais; obter uma ação sinérgica e ainda prevenir o desenvolvimento de microrganismos resistentes ao produto [27].

São utilizadas combinações de conservantes antimicrobianos pertencentes aos mesmos agrupamentos químicos, que atuam da mesma forma sobre os microrganismos [28]. Um exemplo comum na indústria farmacêutica é utilização de dois parabenos em simultâneo, o metilparabeno e o propilparabeno [29]. Ao contrário do que acontece com o sinergismo, em que os conservantes atuam de diferentes formas sobre os microrganismos [28].

Os conservantes podem ser classificados consoante o seu mecanismo de ação, em agentes antioxidantes, agentes antimicrobianos e agentes quelantes.

Os antioxidantes são agentes auto-redutores que evitam a oxidação dos componentes que são sensíveis ao oxigénio, prevenindo a oxidação do produto. Exemplos de antioxidantes utilizados na indústria farmacêutica são o ácido ascórbico, o hidroxitolueno butilado (BHT) e o butil-hidro-xianisol (BHA) [30].

Os conservantes antimicrobianos são agentes que agem contra diversos microrganismos afetando as diferentes estruturas das células microbianas, inibindo o seu crescimento. A parede celular, a membrana plasmática e o citoplasma são os principais alvos destes conservantes. A seleção do tipo de conservante é influenciado por fatores, tais como o doseamento de conservante, a sua interação com os outros componentes da formulação e sua ação antimicrobiana. Os parabenos, benzoato de sódio e sorbato de potássio são exemplos de agentes antimicrobianos utilizados em produtos farmacêuticos [30].

Os agentes quelantes são agentes que formam um complexo com outros ingredientes farmacêuticos da formulação e previnem assim a degradação do produto [30]. Um agente quelante comumente usado é o EDTA, em concentrações recomendadas de 0,01% a 0,1% [31]. O EDTA por si só tem uma fraca atividade antimicrobiana. No entanto, quando combinado com outros conservantes, nomeadamente, compostos de amónio quaternários, permite melhorar a atividade desses conservantes [32].

Em função do tipo de conservante torna-se importante definir a concentração mínima efetiva de conservantes, pois a sua presença em quantidades insuficientes pode resultar no crescimento de microrganismos comprometendo a qualidade do produto. Por outro lado, em quantidades excessivas, os conservantes são normalmente substâncias tóxicas que podem por em risco a segurança do consumidor [33].

Os conservantes devem seguir as diretrizes e regulamentos estabelecidos pela Entidade Regulamentar Infarmed. Esses regulamentos limitam o tipo e o nível de uso de conservantes que podem ser incluídos em cada produto [34].

Nos produtos cosméticos, os conservantes convencionais que são aprovados pelas entidades regulamentares, constam no anexo V do regulamento 1223/2009, assim como a concentração máxima autorizada, limitações e requisitos, e ainda as condições de uso [4].

As concentrações diferem consoante o tipo de aplicação do produto: preparações parenterais, suspensões e soluções orais ou tópicas, como está descrito na tabela 2.3.

No desenvolvimento de novos produtos ou para determinar o efeito antibacteriano e/ou antifúngico de determinadas substâncias ou produtos, como é o caso de novos conservantes, recorre-se a um teste de determinação da concentração mínima inibitória (CMI). A CMI é a concentração de conservante mínima a partir da qual o agente é capaz de inibir o crescimento de um microrganismo sob determinadas condições estabelecidas [26]. Atualmente, existem diferentes métodos para determinar a CMI. Os mais comuns são os métodos das diluições sucessivas e o método de difusão em agar [35].

No entanto, é sempre necessário recorrer a ensaios de eficácia de conservantes para comprovar a concentração mínima eficaz de conservante.

2.3. Ensaio de Eficácia de Conservantes (EEC)

O Ensaio de eficácia de conservantes, também conhecido por “*Challenge Test*”, tem como objetivo avaliar a resistência de um produto à contaminação microbiana, refletindo a eficácia antimicrobiana do conservante presente na formulação. Encontra-se definido em todas as farmacopeias (Americana, Europeia e Japonesa), na norma ISO 11930 e nas diretrizes da Associação de Cosméticos, Higiene Pessoal e Fragrâncias (CFTA).

É necessário realizar EEC durante a fase de desenvolvimento galénico, durante o *scale-up* e

Tabela 2.3- Concentrações típicas dos conservantes comuns na indústria farmacêutica [36-42]

Conservantes	Tipo de produto	Concentração típica (%)
Ácido benzóico	Suspensões orais	0,1
	Soluções orais	0,01-0,1
Benzoato de sódio	Preparações orais	0,02-0,5
	Produtos parenterais	0,5
	Cosméticos	0,1-0,5
Sorbato de Potássio	Cosméticos	0,05-0,2
	Farmacêuticos: preparações orais e tópicas	0,1-0,2
Clorohexidina	Cosméticos	0,01-0,1
	Antissépticos tópicos	0,02
	Farmacêuticos: Preparações oftálmicas e parenterais	0,0025-0,01
Metilparabeno+ Propilparabeno	Preparações parenterais	0,08-0,1/0,001-0,023
	Preparações oftálmicas	0,05/0,01
	Produtos orais	Não aplicável

no final do prazo de validade do produto [43]. Este teste não é realizado, normalmente, no controlo microbiológico de rotina [5].

Durante a fase de desenvolvimento galénico, recorre-se ao ensaio para determinar a eficácia do conservante selecionado e avaliar se a concentração utilizada é a mais adequada e eficaz. Após adicionar o conservante, e durante a formulação, quando adicionados os outros componentes, podem ocorrer alterações que afetem a eficácia do mesmo. Por isso, a eficácia do conservante é testada na formulação final, e não apenas no conservante isolado [44]. Na fase de desenvolvimento o produto é formulado com diferentes concentrações de conservante e todas estas formulações são submetidas a EEC, de modo a obter a concentração mínima eficaz de conservante. Dados históricos de outros produtos comercializados podem servir de base na seleção do conservante, assim como a concentração adequada para o produto [8].

Tal como foi referido anteriormente, os EEC são realizados no final do prazo de validade do produto para comprovar que o conservante antimicrobiano é eficaz até ao final da vida útil do

mesmo. No entanto, em casos pontuais pode ser necessário fazer os EEC num momento intermédio [45]. Isto acontece quando se pretende avaliar casos em que os conservantes se degradam ou são adsorvidos pelo material de acondicionamento ao longo do tempo, como representado na figura 2.1. Isto porque o tipo de material de embalagem onde se armazena o produto pode ter impacto na atividade antimicrobiana do conservante [46].

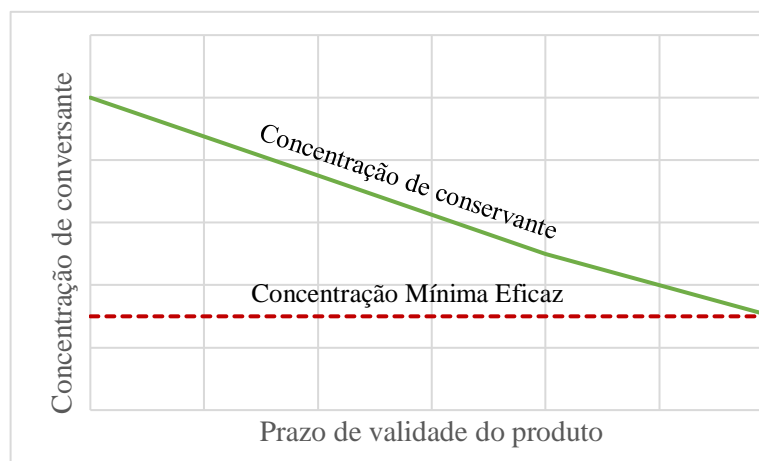


Figura 2.1- Redução da concentração de conservante ao longo do tempo

A ampliação da escala laboratorial para escala industrial (*scale-up*), pode afetar o desempenho dos agentes antimicrobianos. Condições de processamento como, a ordem de adição de um componente, o pH e/ou a temperatura de um lote durante o processo de produção, podem alterar a atividade antimicrobiana ou a estabilidade do conservante num determinado produto. Por isso, o ensaio de eficácia é realizado também em lotes industriais para confirmar a eficácia do agente antimicrobiano [12].

Este ensaio consiste em inocular o produto com microrganismos específicos numa concentração conhecida e posteriormente, avaliar o produto em intervalos de tempo definidos, verificando se há redução logarítmica da população microbiana e comparar os resultados obtidos com os limites estabelecidos.

O *Challenge Test* apresenta diferentes abordagens (farmacopeias, norma ISO 11930 e diretrizes da CTFA), consoante o tipo de produto que se pretende analisar. Estes métodos diferem no tipo de microrganismos padrão, na preparação do inóculo, meios de cultura, solventes e neutralizantes utilizados, utilização de culturas puras ou mistas, nos tempos de amostragem após a inoculação e nos critérios de aceitação [8]. Assim a metodologia descrita pelas diferentes farmacopeias é direcionada para produtos farmacêuticos enquanto que a norma ISO 11930 e as diretrizes do CFTA são específicas para produtos cosméticos e de cuidados pessoais.

Independentemente das diferenças notórias nestas metodologias, o ensaio de eficácia de conservantes compreende as etapas gerais esquematizadas na figura 2.2.



Figura 2.2- Etapas do ensaio de eficácia de conservantes (adaptado de [16]).

Formas de neutralizar o sistema conservante do produto devem ser estudadas e validadas antes de iniciar o EEC, a fim de garantir a neutralização da atividade antimicrobiana (etapa 4 da figura 2.2.). E desta forma, garantir a recuperação dos microrganismos inoculados, uma vez que a atividade antimicrobiana no produto pode inibir esses microrganismos, levando a resultados pouco credíveis. A eficácia da neutralização é feita recorrendo a um teste de validação, onde se define todos os meios de cultura, solventes e neutralizantes, antecipadamente, para poderem ser utilizados no Ensaio de Eficácia de Conservantes. Tratando-se de um método microbiológico, considera-se que este está validado quando atingida a taxa de recuperação de microrganismos exigida (descrito mais detalhadamente na secção 2.4).

2.3.1. Ensaio de eficácia de conservantes em medicamentos e suplementos alimentares: comparação entre farmacopeias

Os capítulos das diferentes farmacopeias (Europeia, Americana e Japonesa), referentes à avaliação da eficácia antimicrobiana, estão essencialmente harmonizados em relação ao princípio subjacente à realização do teste. No entanto, apresentam diferenças no que diz respeito à seleção dos microrganismos padrão, tempos de amostragem após inoculação e critérios de aceitação [8].

As farmacopeias definem critérios de aceitação para diferentes tipos de produtos consoante o tipo de via de administração, de modo a ser possível fazer uma comparação com os resultados experimentais obtidos nos ensaios efetuados. Cada farmacopeia faz uma divisão diferente dos produtos por categorias tal como é representado na tabela 2.4.

Tabela 2.4- Categorias de produtos segundo as farmacopeias [1, 3, 47]

Farmacopeia Europeia (EP)	Farmacopeia dos Estados Unidos (USP)	Farmacopeia Japonesa (JP)
1. Preparações parenterais, oftálmicas, intrauterinas e intramamárias 2. Preparações via ouvido, nasais, tópica e por inalação 3. Preparações orais, oromucosal e retal	1. Injeções, outros parenterais, incluindo emulsões, produtos óticos, produtos nasais estéreis e produtos oftálmicos 2. Produtos com uso tópico, produtos nasais não-esterilizados e emulsões, inclusive os aplicados às mucosas. 3. Produtos orais que não sejam antiácidos 4. Antiácidos (todos feitos com bases aquosas)	1. (feitas com bases aquosas) 1.A. Injeções e outros parenterais incluindo produtos óticos e oftálmicos estéreis 1.B. Parenterais não esterilizados 1.C. Produtos orais 2. Todas as formas de dosagens listadas na categoria I feitas com bases não aquosas

Os microrganismos padrão usados no teste devem ser representativos daqueles que se espera encontrar em cada tipo de produto [48]. A farmacopeia japonesa (JP) recomenda para além das cinco espécies representadas na tabela abaixo, a utilização de isolados *in-house*, isto é, contaminantes que podem resultar do monitoramento ambiental ou do próprio processo de produção [47]. Os microrganismos utilizados pelas três farmacopeias encontram-se descritos na tabela 2.5.

Tabela 2.5- Microrganismos padrão utilizados por cada farmacopeia [1, 3, 47]

EP	USP	JP
1. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ; 2. <i>Staphylococcus aureos</i> ; 3. <i>Candida albicans</i> ; 4. <i>Aspergillus brasiliensis</i> . <u>Casos particulares:</u> 1. <i>Escherichia coli</i> (para preparações orais); 2. <i>Zygosaccharomyces rouxii</i> (para preparações com elevada concentração de açúcar).	1. <i>Escherichia coli</i> ; 2. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ; 3. <i>Staphylococcus aureos</i> ; 4. <i>Candida albicans</i> ; 5. <i>Aspergillus brasiliensis</i> .	1. <i>Escherichia coli</i> ; 2. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ; 3. <i>Staphylococcus aureos</i> ; 4. <i>Candida albicans</i> ; 5. <i>Aspergillus brasiliensis</i> . <u>Casos particulares:</u> 1. Isolados <i>in-house</i> .

Etapa 1- Preparação das Suspensões microbianas padrão

O ensaio inicia com a preparação dos microrganismos, em que se pretende obter uma concentração microbiana de 1×10^8 ufc/ml (unidades formadoras de colônias por mililitro) [1].

Os microrganismos estão disponíveis em pastilhas liofilizadas solúveis em água que contêm um número preciso dos mesmos (ufc/pastilha). Juntamente com as pastilhas vêm os respectivos certificados com a concentração microbiana de cada lote de microrganismo e onde é especificado o volume de solução que deve ser utilizado para a hidratação das mesmas. Os fluidos recomendados pelas diferentes farmacopeias encontram-se na tabela 2.6.

Etapa 2- Inoculação das suspensões microbianas no produto

No primeiro dia do ensaio, as amostras do produto e um controlo positivo são individualmente inoculados com cada uma das suspensões microbianas até obter uma determinada concentração de microrganismos no produto. O tamanho da amostra necessária, as concentrações de microrga-

Tabela 2.6- Preparação do inóculo segundo as farmacopeias (Adaptado de [8])

	EP	USP	JP
Bactéria:	Fluido: diluir em solução salina		Fluido: diluir em solução salina ou 0,1% água peptonada (APT)
<i>S. aureus</i> <i>P. aeruginosa</i> <i>E. coli</i>	Usar suspensão: imediatamente Refrigerar: não menciona	Usar suspensão: dentro de 24 h. Refrigerar: se não for usado dentro de 2 h	
Levedura:	Fluido: diluir em solução salina		Fluido: diluir em solução salina ou 0,1% água peptonada
<i>C. albicans</i>	Usar suspensão: imediatamente Refrigerar: não menciona	Usar suspensão: dentro de 24 h Refrigerar: se não for usado dentro de 2 h	
Fungo:	Fluido: diluir em solução salina com 0,05% Polissorbato 80 (<i>tween</i> ® 80)		Fluido: diluir em solução salina com 0,05% <i>tween</i> ® 80 ou 0,1% água peptonada
<i>A. brasiliensis</i>	Usar suspensão: imediatamente Refrigerar: não menciona	Refrigerar: até 7 dias	Refrigerar: se não for usado dentro de 2 h

nismos no início e nas soluções finais estão bem definidas pelas diferentes farmacopeias (tabela 2.7).

Tabela 2.7- Requisitos das farmacopeias para o Ensaio de Eficácia de Conservantes [1, 3, 47]

	EP	USP	JP
Tamanho da amostra	10 g ou ml do produto	Embalagem original do produto	Embalagem original do produto ou 10 a 20 g ou ml do produto
Quantidade do inóculo	≤1% do volume da amostra	0,5-1% do volume da amostra	≤1% do volume da amostra
Contagens ufc no produto	10 ⁵ -10 ⁶ ufc/ml ou g de produto	Categorias 1 a 3: 10 ⁵ -10 ⁶ ufc/ml ou g de produto Categoria 4: 3: 10 ³ -10 ⁴ ufc/ml ou g de produto	Categorias 1 a 3: 10 ⁵ -10 ⁶ ufc/ml ou g de produto Categoria 4: 3: 10 ³ -10 ⁴ ufc/ml ou g de produto
Duração total do ensaio	28 dias	28 dias	28 dias

O produto inoculado deve ser bem homogeneizado para permitir a dispersão uniforme da suspensão microbiana na amostra. No entanto, existem produtos de difícil homogeneização, como os produtos semi-sólidos [49], em que é difícil garantir a total distribuição uniforme do inóculo no produto. Nestes casos a falta de homogeneidade do inóculo na amostra pode conduzir a que o inóculo fique altamente concentrado em algumas partes da amostra e noutras não tenham estado sequer em contacto com o microrganismo [50]. A farmacopeia japonesa recomenda aquecer a amostra a uma temperatura de 45°C a 50°C até que fique oleosa e após baixar a temperatura, adicionar a suspensão microbiana, mexendo uniformemente. Para confirmar a dispersão uniforme visualmente, a JP refere a incorporação de um indicador (vermelho de fenol) na mistura. Este indicador é conhecido por não ter influência na sobrevivência ou crescimento dos microrganismos. Pode ainda ser necessário adicionar um tensioativo como o Polissorbato 80, Lecitina ou o Monooleato de sorbitano que melhoram a miscibilidade entre a amostra semi-sólida e o meio líquido utilizado. No entanto é necessário validar se estes tensioativos não têm nenhum efeito sobre os microrganismos utilizados [47]. A farmacopeia europeia sugere a adição de miristato de isopropilo, esterilizado por filtração ou adicionar uma quantidade mínima de polissorbato 80 estéril ou outro agente tensioativo, aquecendo se necessário até os 40 a 45°C [51].

Etapas 3 e 4- Remover pequenas amostras em intervalos específicos e neutralização da atividade antimicrobiana do produto

Em intervalos de tempos específicos, consoante o tipo de preparação, são recolhidas pequenas alíquotas e determina-se o número de microrganismos viáveis recorrendo a métodos de contagem de placas (incorporação ou espalhamento) ou à filtração por membrana [52, 53]. Em cada tempo do ensaio é necessário garantir que o método de neutralização validado elimina eficazmente a atividade antimicrobiana do produto recorrendo a diluições, filtração por membrana ou ainda utilizando agentes neutralizantes específicos.

Como os microrganismos não têm condições de crescimento iguais, os meios de cultura utilizados assim como a temperatura e duração de incubação, presentes na tabela 2.8, diferem de microrganismo para microrganismo. As três farmacopeias não se encontram harmonizadas em relação às condições ótimas de crescimento dos microrganismos, no entanto as diferenças existentes não têm influência significativa nos resultados obtidos [8].

Tabela 2.8- Meios de cultura e condições de incubação dos microrganismos segundo as farmacopeias [8, 52, 53]

Farmacopeias		EP	USP	JP
Bactéria: <i>S. aureus</i> <i>P. aeruginosa</i> <i>E. coli</i>	Meio de crescimento	<i>Trypticase Soy Agar</i> (TSA)	TSA	TSA
	Temperatura de incubação	30-35°C	30-35°C	30-35°C
	Duração de incubação	3-5 dias	3-5 dias	≤3 dias
Levedura: <i>C. albicans</i>	Meio de crescimento	<i>Sabouraud Dextrose Agar</i> (SDA)	SDA	SDA, <i>Glucose Peptone Agar</i> (GPA) ou <i>Potato Dextrose Agar</i> (PDA)
	Temperatura de incubação	20-25°C	20-25°C	20-25°C
	Duração de incubação	5-7 dias	3-5 dias	≤5 dias
Fungo: <i>A. brasiliensis</i>	Meio de crescimento	SDA	SDA	SDA, GPA ou PDA
	Temperatura de incubação	20-25°C	20-25°C	20-25°C
	Duração de incubação	5-7 dias	3-7 dias	≤5 dias

Todas as farmacopeias recomendam o armazenamento das amostras inoculadas a 20-25°C durante todo o ensaio [1, 3, 47]. As farmacopeias europeia e japonesa aconselham ainda que o produto seja armazenado protegido da luz [1, 47].

Etapas 5 e 6-Recuperação dos microrganismos sobreviventes e cálculo da percentagem ou redução \log_{10} dos mesmos

As maiores diferenças entre as farmacopeias são nos critérios de aceitação, que definem a eficácia antimicrobiana dos produtos. Estes são expressos em termos de redução logarítmica do número de microrganismos em função do tempo de amostragem, que variam para as diferentes categorias de produtos e o tipo de forma de dosagem. As contagens de colónias obtidas são convertidas em \log_{10} e são comparados com o valor obtido no inóculo no dia da inoculação, conhecido por controlo positivo. Apenas a farmacopeia japonesa apresenta os seus critérios em termos de percentagens de redução, tal como se encontram na tabela 2.9.

Tabela 2.9- Critérios de aceitação da Farmacopeia Japonesa [47]

	Percentagem de redução (%)							
	Categoria IA		Categoria IB		Categoria IC		Categoria ID ou II	
	14 dias	28 dias	14 dias	28 dias	14 dias	28 dias	14 dias	28 dias
Bactéria	$\leq 0,1\%$ de cfu inicial	\leq nível após dia 14	1% cfu inicial	\leq nível após dia 14	10% de cfu ini- cial	\leq nível após dia 14	\leq cfu inicial	\leq cfu inicial
Levedura e fungo	\leq cfu inicial	\leq cfu inicial	\leq cfu inicial	\leq cfu inicial	\leq cfu inicial	\leq cfu inicial	\leq cfu inicial	\leq cfu inicial

A farmacopeia europeia possui critérios A, que são os níveis de eficácia que por norma se pretende atingir, mas em casos justificados, se os critérios A não puderem ser atingidos, aplicam-se os critérios B. A EP tem um controlo mais apertado, na medida em que requer uma avaliação passado 6h após a inoculação, para preparações oftálmicas e parenterais.

A farmacopeia europeia recomenda fazer uma análise de pequenas amostras nos tempos 6 e 24 horas, 2, 7, 14 e 28 dias dependendo do tipo de formulação. As preparações oftálmicas e parenterais são avaliadas logo após 6 horas, preparações tópicas são avaliadas passado 2 dias e preparações orais passado 14 dias. Enquanto que a farmacopeia americana sugere tempos de amostragem a partir de 7 dias e a japonesa a partir de 14 dias. Estas diferenças encontram-se na tabela 2.10.

A USP define “nenhum aumento” como não mais do que $0,5 \log_{10}$ acima do valor obtido anteriormente. Ao contrário da EP, a USP apenas aplica um critério de aceitação.

Tabela 2.10- Comparação entre os critérios de aceitação das farmacopeias EP e USP [1, 3]

Categoria 1- Preparações parenterais e oftálmicas						
Critério	Microrganismo	Redução Log ₁₀				
		6 horas	24 horas	7 dias	14 dias	28 dias
EP (critério A)	Bactéria	2	3	-	-	NR ¹
EP (critério B)		-	1	3	-	NA ²
USP		-	-	1	3	NA
EP (critério A)	Levedura e fungo	-	-	2	-	NA
EP (critério B)		-	-	-	1	NA
USP		-	-	NA	NA	NA
Categoria 2-Preparações tópicas						
Critério	Microrganismo	Redução Log ₁₀				
		2 dias	7 dias	14 dias	28 dias	
EP (critério A)	Bactéria	2	3	-	NA	
EP (critério B)		-	-	3	NA	
USP		-	-	2	NA	
EP (critério A)	Levedura e fungo	-	-	2	NA	
EP (critério B)		-	-	1	NA	
USP		-	-	NA	NA	
Categoria 3- Preparações orais						
Critério	Microrganismo	Redução Log ₁₀				
		14 dias	28 dias			
EP	Bactéria	3	NA			
USP		1	NA			
EP	Levedura e fungo	1	NA			
USP		NA	NA			
Categoria 4- Líquidos antiácidos						
Critério	Microrganismo	Redução Log ₁₀				
		14 dias	28 dias			
USP	Bactéria	NA	NA			
	Levedura e fungo	NA	NA			

¹NR: nenhuma recuperação; ²NA: nenhum aumento quando comparado com o valor do tempo anterior

2.3.2. Ensaio de eficácia de conservantes em cosméticos

A norma ISO 11930 e as diretrizes da CTFA descrevem uma metodologia para avaliar especificamente a eficácia de conservantes em produtos cosméticos. O procedimento é semelhante ao das farmacopeias, apresentando algumas diferenças nos microrganismos padrão, meios de cultura utilizados, quantidade necessária da amostra de produto, condições de incubação, critérios de aceitação e tempos de amostragem.

Em 2007, a Associação de Cosméticos, Higiene Pessoal e Fragâncias (CTFA) mudou o seu nome para Conselho de Produtos de Cuidados Pessoais (PCPC) [54]. A CTFA apresenta diretrizes específicas para cada produto que se pretende avaliar. A CTFA M-3 é utilizado para produtos de cuidado pessoal miscíveis em água; CTFA M-4 é específico para produtos cosméticos para olhos; CTFA M-5 para produtos não tecidos e ainda CTFA M-6 para produtos atópicos.

Em 2012, surgiu a norma ISO 11930, destinada a avaliar a eficácia antimicrobiana de cosméticos solúveis em água ou miscíveis em água [55].

O método descrito pela CTFA recomenda a utilização de culturas puras ou mistas. Enquanto que a utilização de culturas puras permite determinar a resistência do produto a cada tipo de microrganismo, as culturas mistas permitem simular um perfil mais real de contaminação num produto, contaminando a amostra com mais do que um microrganismo [56].

A CFTA sugere ainda uma reexposição, a meio dos 28 dias do ensaio, ainda com mais microrganismos especialmente se for um produto de dose múltipla [57]. A repetição da inoculação no mesmo produto pode indicar como o conservante presente na formulação resistirá a múltiplas contaminações durante o uso efetuado pelo consumidor [58].

A norma ISO e as diretrizes da CTFA recomendam a utilização de diferentes microrganismos presentes na tabela 2.11.

Na tabela 2.12 encontram-se as diferenças que existem relativamente ao tamanho da amostra de produto necessária para realizar o ensaio, a quantidade de microrganismo a inocular, assim como as concentrações microbianas que se pretendem atingir.

A norma ISO recomenda que o produto já inoculado deve repousar 30 ± 15 minutos antes de fazer a quantificação por filtração por membrana ou outro método de contagem de placas [55]. As diretrizes da CTFA não mencionam nenhum tempo específico de repouso.

Tal como as farmacopeias, estes métodos referem a necessidade de demonstrar a eficácia de neutralização da atividade antimicrobiana (validação das condições apropriadas para realização dos ensaios), antes de iniciar o EEC.

As principais diferenças entre as diretrizes CTFA e da norma ISO são os meios de cultura utilizados e as condições de incubação (tabela 2.13).

Tal como nas farmacopeias, os critérios de aceitação da CFTA e da norma ISO são apresentados em termos de redução \log_{10} do número de microrganismos. As contagens de colónias con-

Tabela 2.11- Microrganismos padrão sugeridos pela ISO 11930 e pela CTFA [55, 59]

CTFA	ISO 11930
<ul style="list-style-type: none"> • <i>S. aureus</i>; <i>Staphylococcus epidermidis</i> • <i>Klebsiella pneumoniae</i>; <i>Enterobacter cloacae</i>; <i>Escherichia coli</i>; <i>Proteus species</i>; <i>Enterobacter gergoviae</i> • <i>P. aeruginosa</i>; <i>Burkholderia cepacia</i>; <i>Pseudomonas fluorescens</i>; <i>Pseudomonas putida</i>; <i>Flavobacterium species</i>; <i>Acinetobacter species</i> • <i>C. albicans</i>; <i>Candida parapsilosis</i> • <i>Aspergillus niger</i>; <i>Penicillium luteum</i> • <i>Bacillus subtilis</i> • Isolados <i>In-House</i> 	<ul style="list-style-type: none"> • <i>P. aeruginosa</i> • <i>S. aureus</i> • <i>E. coli</i> • <i>C. albicans</i> • <i>A. brasiliensis</i>

Tabela 2.12- Requisitos para a realização do Ensaio de Eficácia de Conservantes segundo a norma ISO 11930 e as diretrizes da CTFA (adaptado de [60])

	CTFA	ISO 11930
Contagem ufc inóculo	Bactéria- 1×10^8 cfu/ml Levedura e fungo- 1×10^7 cfu/ml No caso de produtos para olhos-tem de ser adaptado à quantidade de inóculo	Bactéria - 1×10^7 - 1×10^8 cfu/ml Levedura- 1×10^6 - 1×10^7 cfu/ml Fungo- 1×10^8 cfu/ml
Tamanho da amostra	Embalagem final	20 g ou ml
Quantidade a inocular	Produtos miscíveis em água: $\leq 1\%$ Produtos para olhos: 0,1%-1%	1% do volume do produto
Contagem ufc no produto	Bactéria: 1×10^6 cfu/ml Levedura e fungo: 1×10^5 cfu/ml	Bactéria: 1×10^4 - 1×10^5 cfu/ml Levedura e fungo: 1×10^5 - 1×10^6 cfu/ml

vertidas em \log_{10} , são comparadas com o valor obtido no inóculo no dia zero e também em relação ao valor obtido no tempo anterior.

Assim como a farmacopeia europeia, a norma ISO 11930 também define critérios A e B.

Em termos de tempos de amostragem, a CTFA recomenda também a avaliação no dia 21.

Tabela 2.13- Meios de cultura e condições de incubação recomendados pela ISO e CTFA [61]

	Condições de crescimento	CTFA	ISO 11930
Bactéria	Meio de cultura	TSA	TSA
	Temperatura de incubação	30-37°C	30-35°C
	Duração de incubação	1-2 dias	2-3 dias
Levedura	Meio de cultura	SDA, TSA ou agar/caldo micofílico	SDA
	Temperatura de incubação	25-35°C	30-35°C
	Duração de incubação	2-3 dias	2-3 dias
Fungo	Meio de cultura	SDA, PDA, agar micofílico ou agar extrato de malte	PDA
	Temperatura de incubação	20-30°C	20-25°C
	Duração de incubação	3-7 dias	3-5 dias

Na tabela 2.14 estão compilados os critérios de aceitação da ISO e da CTFA.

Tabela 2.14- Comparação entre os critérios de aceitação segundo a norma ISO 11930 e as diretrizes da CFTA [12, 55, 60]

Critério	Microrganismo	Redução Log ₁₀			
		7 dias	14 dias	21 dias	28 dias
CFTA M-3	Bactéria	≥3	≥3 e NA ¹	≥3 e NA	≥3 e NA
CFTA M-4		≥3	RC ²	RC	RC
ISO (critério A)		≥3	≥3 e NA	-	≥3 e NA
ISO (critério B)		-	≥3	-	≥3 e NA
CFTA M-3	Levedura⁴	≥1	RC	RC	RC
CFTA M-4		≥1	NA	NA	NA
ISO (critério A)		-	≥0 ³	-	≥1 e NA
ISO (critério B)		-	≥0	-	≥0 e NA
ISO (critério A)	Fungo	≥1	≥1 e NA	-	≥1 e NA
ISO (critério B)		-	≥1	-	≥1 e NA

¹NA- Nenhum aumento em relação ao valor do tempo anterior; ²RC-Redução contínua em relação ao valor do tempo anterior; ³≥0-Nenhum aumento a partir da contagem inicial; ⁴ CTFA aplica os mesmos critérios para leveduras e fungos

2.3.3. Método alternativo ao ensaio de eficácia de conservantes

Existem métodos alternativos ao Ensaio de Eficácia de Conservantes com o mesmo propósito, nomeadamente, o método da regressão linear. Este método foi proposto por Orth para estimar a eficácia do sistema conservante mais rapidamente, reduzindo o tempo necessário para a realização do teste.

Segundo Orth, cada microrganismo possui uma taxa de morte característica quando submetido a um determinado agente antimicrobiano. Assim este método fornece a taxa de inativação dos microrganismos através do valor D. Sendo o valor D, o tempo necessário para a redução de 90% da população de microrganismos [33].

No entanto este método apresenta algumas desvantagens. Uma delas é a extrapolação de matar além dos dados medidos. E ainda o fato de assumir uma relação linear entre o tempo de exposição do agente antimicrobiano e o número de microrganismos sobreviventes. Por isso, apesar deste método ser útil para fazer uma triagem preliminar rápida de conservantes, não deve ser utilizado como única solução para avaliar a eficácia de conservantes [62].

2.3.4. Métodos de quantificação do número de células viáveis

Estes métodos são aplicados para verificar se um produto está em conformidade com as especificações estabelecidas para a qualidade microbiológica [51]. A seleção do método depende de vários fatores, nomeadamente da natureza do produto e do limite estabelecido de microrganismos [52].

Tal como nos controlos microbiológicos, nos Ensaio de Eficácia de Conservantes também existem especificações estabelecidas de modo a verificar a eficácia dos produtos ao longo do tempo. Por isso é necessário recorrer a métodos que permitam determinar o número de microrganismos presentes no produto em análise.

Qualquer método utilizado para fazer a quantificação dos microrganismos envolve:

➤ Controlo negativo

O controlo negativo é realizado com o intuito de certificar que o meio e o solvente utilizados assim como a adição de um neutralizante, caso se aplique, não se encontrem contaminados. Desta forma, é garantido que nos ensaios realizados, se houver uma possível contaminação, não se deve a estes fatores. Caso um controlo negativo falhe, requer uma investigação de modo a averiguar a origem da contaminação [51].

Como em qualquer ensaio microbiológico, é necessário realizar um controlo ambiental durante todo o ensaio de modo a verificar que não existiu qualquer contaminação proveniente do meio envolvente.

➤ **Promoção do meio de crescimento**

O meio de cultura utilizado deve ter a capacidade de suportar o crescimento microbiano, assim cada vez que é preparado um lote novo de um meio de cultura é necessário proceder à promoção do meio de crescimento [51].

➤ **Método de quantificação do número de colónias:**

Filtração por membrana

O produto em análise é filtrado recorrendo a uma membrana. Os poros da membrana não deverão ter um diâmetro maior do que $0,45\ \mu\text{m}$ e o tipo de material não deve afetar a eficiência da retenção dos microrganismos [51]. Normalmente o material usado é o difluoreto de polivinilideno (PVDF), celulose ou nylon [5]. Para cada microrganismo, é utilizada uma membrana de filtração.

Previamente, o produto tem de ser diluído ou dissolvido numa solução neutralizante apropriada. A farmacopeia europeia recomenda a filtração de 1 grama ou mililitro de produto e depois procede-se à lavagem da membrana com um volume adequado de solvente, de modo a arrastar qualquer vestígio de produto que eventualmente tenha ficado retido no copo de filtração. Desta forma, a filtração por membrana não exige a realização de placas em duplicado [51, 53]. Por fim coloca-se a membrana nas placas de agar e são incubadas nas condições apropriadas [51].

A filtração por membrana é o método de quantificação de colónias que consegue detetar concentrações mais baixas. Este método tem ainda como vantagem conseguir neutralizar a atividade antimicrobiana do produto, uma vez que tem a capacidade de deixar passar os agentes antimicrobianos, ficando apenas os microrganismos retidos na membrana de filtração [63].

O método de filtração encontra-se esquematizado na figura 2.3.

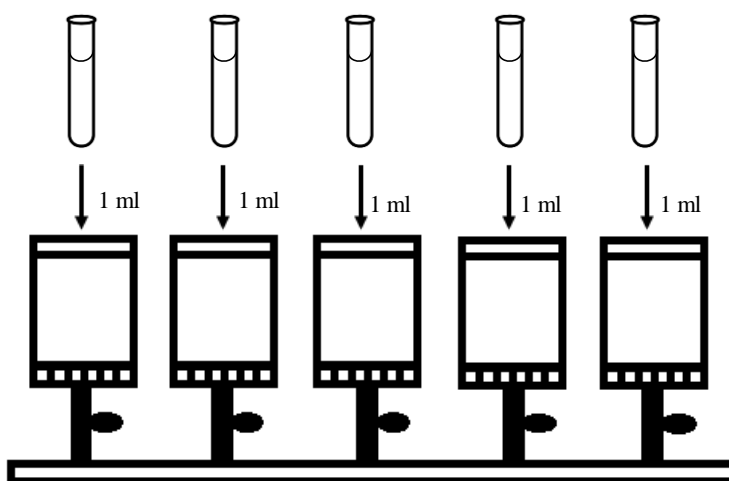


Figura 2.3- Método da filtração por membrana. (adaptado de [64])

Métodos de contagem de placas

Segundo a EP, o método da contagem de placas pode ser efetuado por incorporação ou por espalhamento. Assim como na filtração, o produto é previamente dissolvido ou diluído.

Quer por incorporação ou por espalhamento, as placas são feitas em duplicado, ou seja, a amostra é colocada em 2 placas. O respetivo resultado é a média das colónias obtidas nas duas placas [51].

1. Método de incorporação

É colocado 1 ml da amostra em cada uma das duas placas de Petri com cerca de 9 cm de diâmetro e adicionado cerca de 20 ml do meio de cultura apropriado (TSA ou SDA) a uma temperatura de 45°C (figura 2.4).

Este método apresenta como vantagens, a simplicidade e a capacidade de detetar concentrações mais baixas do que o método de espalhamento. Uma desvantagem deste método é que pode ser difícil detetar visualmente as colónias de *Pseudomonas aeruginosa*, por serem muito pequenas e poderem surgir na parte mais profunda do agar [63].

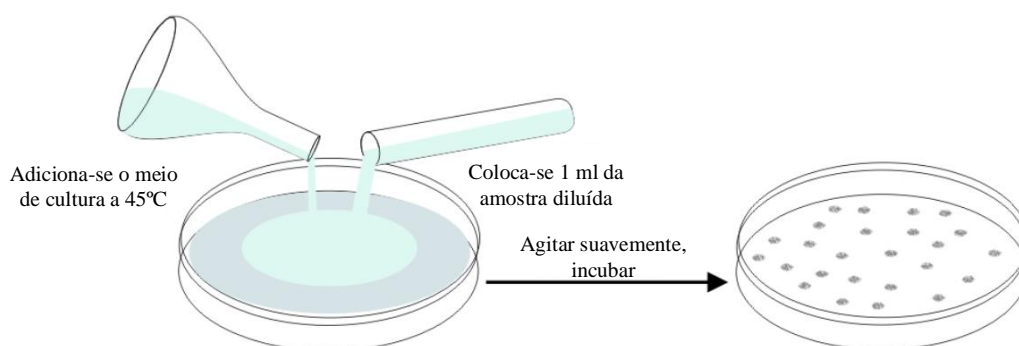


Figura 2.4- Método de incorporação. (adaptado de [65])

2. Método de espalhamento

Em placas de Petri com cerca de 9 cm de diâmetro são adicionados meios de cultura (TSA ou SDA) e à superfície do meio, já solidificado, é espalhado cerca de 0,1 ml do produto (ver figura 2.5) [51].

Este método permite obter colónias maiores que são mais fáceis de contar e que possuem diferentes características (como a forma e a pigmentação) que permitem ser distinguidas mais facilmente de possíveis contaminações que eventualmente possam ocorrer [63].

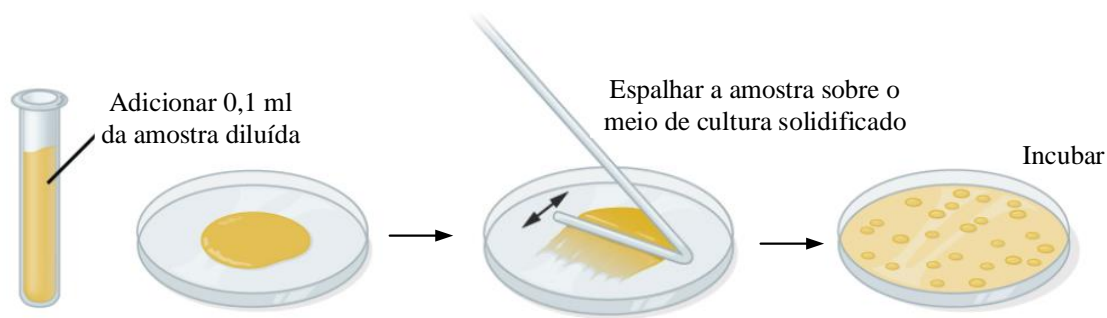


Figura 2.5- Método de espalhamento. (adaptado de [66])

Método do Número-Mais-Provável (MPN)

O método do Número-Mais-Provável, conhecido por MPN, é considerado o método menos rigoroso. Ao contrário dos métodos referidos anteriormente, este método não permite fazer uma contagem direta do número de colónias.

Para a determinação do MPN a amostra deverá ser diluída pelo menos 3 diluições em série de dez. Para cada nível de diluição, 3 alíquotas de 1 grama ou milímetro são inoculadas em 3 tubos com 9 a 10 milímetros de meio de cultura TSB. Depois procede-se à incubação dos mesmos [51].

2.4. Demonstração da eficácia de neutralização- validação

O ensaio de eficácia de conservantes pode dividir-se em duas fases. Numa primeira fase é necessário demonstrar a eficácia do neutralizante sobre qualquer propriedade antimicrobiana do produto. Só após ser garantida a neutralização da atividade antimicrobiana, é iniciada a segunda fase, o *challenge test*, onde os microrganismos padrão são inseridos no produto de modo a determinar a eficácia do conservante para inibir o crescimento destes microrganismos [67].

Segundo Russel, para um neutralizante ser eficaz tem de ser capaz de inibir a atividade antimicrobiana (caso o produto a ser testado tenha); não deve ser tóxico para os microrganismos testes utilizados; e não pode reagir com um componente da formulação formando um composto tóxico [68].

A demonstração da eficácia da neutralização é um teste importante, pois provar que o neutralizante é efetivamente capaz de neutralizar a atividade antimicrobiana, permite obter resultados credíveis durante o ensaio, evitando obter falsos resultados de eficácia antimicrobiana. Caso a validação do método de neutralização não seja cumprida, não há garantia de que a atividade antimicrobiana do produto fica neutralizada durante o período de análise, podendo interferir com a deteção dos microrganismos durante o ensaio [67].

Assim o teste de validação serve para garantir que os microrganismos presentes no produto sejam detetados, caso existam no produto após inoculação.

A validação faz-se inoculando uma quantidade de suspensão de cada microrganismo no produto diluído/dissolvido numa determinada quantidade de solvente neutralizante adequado, que corresponda a menos de 100 ufc/ml. Paralelamente é feito um controlo positivo com a mesma quantidade de suspensão microbiana num determinado volume de solução neutralizante.

O produto inoculado e os respetivos controlos positivos são quantificados posteriormente em placas com os meios adequados através de um dos seguintes métodos: filtração por membrana, incorporação ou espalhamento. As condições de incubação e os meios de cultura variam de microrganismo para microrganismo, tal como já foi referido no capítulo 2.3.

A taxa de recuperação dos microrganismos é determinada comparando o número de colónias obtidas no produto com o obtido no controlo positivo. Nos métodos de incorporação ou espalhamento, em que a própria metodologia pode dificultar a visualização das colónias por aglomeração das mesmas, as placas devem ser feitas em duplicado, considerando como resultado a média das contagens de ufc após o tempo de incubação. Com o resultado final das contagens obtidas na amostra e no controlo positivo é calculado a taxa de recuperação (TR) através da equação 2.1:

$$\text{Taxa de recuperação (TR)} = \frac{n^{\circ} \text{ UFC na amostra}}{n^{\circ} \text{ UFC no controlo positivo}} \times 100\% \quad (2.1)$$

Considera-se validada a metodologia, se a taxa de recuperação microbiana estiver dentro dos limites definidos pela farmacopeia europeia e pela norma ISO 11930 (50% a 200% relativamente ao controlo positivo¹).

Na validação da neutralização são testados e avaliados qual a diluição do produto mais adequada, o neutralizante, solventes e meios de cultura utilizados. Para demonstrar a recuperação microbiana aceitável do produto, a menor diluição possível da amostra deve ser testada [52]. No entanto, há situações em que o fator de diluição tem de ser aumentado, por ser a única forma de neutralizar a atividade antimicrobiana do produto. Em qualquer dos casos, há sempre erros associados ao processo microbiológico, tanto na amostra como no controlo, mas por serem submetidos às mesmas condições (tempos, temperaturas, condições de preparação/operação), matematicamente, esse erro é anulado².

1

Nº UFC (x)	Log ₁₀ (x)	Descrição dos limites aceitáveis
100	2	Valor central
50	1,7	Limite mínimo = Valor central-15%
200	2,3	Limite máximo = Valor central+15%

$$^2 TR = \frac{n^{\circ} \text{ UFC na amostra} \times \text{Erro}}{n^{\circ} \text{ UFC no controlo} \times \text{Erro}} \times 100\% \cong \frac{n^{\circ} \text{ UFC na amostra}}{n^{\circ} \text{ UFC no controlo}} \times 100\%$$

Se o crescimento de microrganismos for inibido no produto, procede-se à modificação do procedimento adotado para obter resultados que cumprem com as especificações. Estas modificações podem inclui [69]:

1. Aumento do volume de diluente ou meio de cultura
2. Incorporação de agentes neutralizantes específicos
3. Filtração por membrana
4. Combinação das medidas acima referidas

Para conservantes que possuem um elevado coeficiente de diluição e menor tendência para se ligar aos microrganismos [70], nomeadamente álcoois e fenóis, utiliza-se a diluição. A diluição permite que o conservante não esteja na sua concentração em que é considerada eficaz.

Para outros conservantes pode ser necessário adicionar um agente de inativação específico, como Lubrol W (4%) ou o Polissorbato (*Tween®*) 80 (3%) [71]. Para cada classe química de conservante existe um neutralizante químico específico, no entanto, selecionar um neutralizante acaba por ser uma tarefa dispendiosa e demorada. Por isso, existiu a necessidade de desenvolver meios neutralizantes capazes de inativar uma ampla gama de conservantes. Existem meios universais que contêm agentes neutralizantes como o caldo de Dey-Engley (DEB) que possui na sua composição tioglicolato de sódio, tiosulfato de sódio, bissulfito de sódio, lecitina e polissorbato 80. Um meio muito utilizado descrito na norma ISO é o Eugon LT100 (Eugon) que contém substâncias neutralizantes como lecitina e polissorbato 80 e ainda um agente dispersante (octoxinol 9).

Na tabela 2.15 constam-se alguns dos agentes neutralizantes mais comuns utilizados quando o produto contém na sua formulação certas substâncias antimicrobianas.

Tabela 2.15- Métodos de neutralização mais adequados para determinados agentes antimicrobianos [51]

Agentes antimicrobianos	Método de neutralização
Glutaraldeído, mercuriais	Hidrogenossulfito de sódio (bissulfito de sódio)
Fenólicos, álcoois, aldeídos, sorbato	Diluição
Aldeídos	Glicina
Compostos de Amónia Quaternários (QACs), para-hidroxibenzoatos (parabenos), bis-biguanidas	Lecitina
QACs, iodo, parabenos	Polissorbato
Mercuriais	Tioglicolato
Mercuriais, halogénios, aldeídos	Tiosulfato
EDTA	Iões Mg^{2+} ou Ca^{2+}

Os microrganismos também podem ser fisicamente separados do produto por filtração, ficando retidos na membrana e deixando passar os agentes antimicrobianos através do filtro. No entanto, os conservantes podem ligar-se às membranas, inibindo a recuperação microbiana. Por isso, o produto deve ser previamente diluído numa solução neutralizante específica, para evitar que tal aconteça [72].

2.5. Efeito das características dos produtos no Ensaio de Eficácia de Conservantes

Para determinar se um produto requer um ensaio de eficácia de conservantes ou não, é feita uma avaliação de risco microbiológico que avalia se o produto é suscetível ao crescimento microbiano. O pH do produto, a atividade da água, teor de álcool ou a capacidade antimicrobiana das matérias-primas do produto podem criar condições desfavoráveis ao crescimento e proliferação dos microrganismos, eliminando a necessidade de conservantes na sua formulação. Caso um produto demonstre um ambiente propício ao crescimento microbiano, os conservantes são adicionados ao produto para garantir a sua segurança e posteriormente, é realizado ensaios de eficácia de conservantes de modo a verificar a eficácia do conservante ao longo do tempo [45].

Existem produtos que são mais suscetíveis ao crescimento microbiano do que outros. O grau de risco microbiológico de um produto está relacionado com a sua capacidade de sustentar o crescimento de microrganismos [73]. Relativamente aos produtos cosméticos, a Comissão Europeia classifica-os consoante o grau de risco microbiológico [74]:

1. Produtos com baixo risco microbiológico: produtos que devido a certas propriedades e características não necessitam de ser submetidos a testes de eficácia de conservantes nem testes de qualidade microbiológica de produto acabado. No entanto tal ausência de testes deve ser devidamente justificada cientificamente.
2. Produtos de uso único e produtos que não podem ser abertos: são necessários apenas testes de qualidade microbiológica de produto acabado. A ausência de testes de eficácia de conservantes também necessita de ser justificada.
3. Todos os outros produtos: requerem testes de eficácia de conservantes assim como testes de qualidade microbiológica de produto acabado.

A probabilidade de contaminação microbiológica para certos produtos é quase inexistente devido às características do produto [10], que incluem a sua composição, as condições de produção, o tipo de embalagem e a combinação destes fatores. Estes fatores podem criar um ambiente

desfavorável ao crescimento de microrganismos. Por isso os produtos considerados “hostis”, apesar de serem produzidos segundo as BPF, apresentam um baixo risco de contaminação microbiológica e, portanto, não necessitam de ensaios de eficácia de conservantes [73].

As características físico-químicas do produto que têm um maior impacto na sobrevivência/crescimento de microrganismos são:

- **Atividade da água (a_w):** A presença de água nos produtos farmacêuticos e cosméticos, torna-os mais suscetíveis ao crescimento microbiano. No entanto, não é o teor de humidade total que determina a probabilidade de crescimento, mas sim a água disponível na formulação. Para avaliar a disponibilidade de água existente, que pode potenciar o desenvolvimento de microrganismos, determina-se a atividade da água do produto [73]. Que é definida como a proporção da pressão de vapor de água do produto e a água pura à mesma temperatura, como representado na equação 2.2. A atividade da água é expressa numa escala de 0 a 1, apresentando o valor de 1 para a água pura [10, 75].

$$Aw = \frac{P}{Po} = \frac{n_1}{(n_1+n_2)} \quad (2.2)$$

Onde P= pressão de vapor de água do produto; P_o= pressão de vapor da água pura; n₁= número de moles de solvente, e n₂= número de moles de água

Cada tipo de microrganismo necessita de um determinado valor de atividade da água para conseguir proliferar. Na tabela 2.16 encontram-se listados exemplos de valores de atividade de água requeridos para o crescimento para cada tipo de microrganismo.

Determinadas formulações farmacêuticas como comprimidos, cápsulas, líquidos não aquosos e pomadas que apresentam atividade de água abaixo dos 0,75, não são suscetíveis de crescimento microbiano [73]. Na norma ISO 29621 está referido, especificamente, que produtos com atividade de água abaixo dos 0,75 não requerem o ensaio de eficácia de conservantes, pois considera que estes produtos não representam risco de sofrerem contaminações microbianas [10, 76].

Tabela 2.16- Valores de Atividade de água (a_w) necessários para suportar o crescimento de diferentes microrganismos [10, 76, 77]

Microrganismos	Atividade de água, a_w
<i>Escherichia Coli</i> (bactéria)	0,95
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (bactéria)	0,97
<i>Staphylococcus aureus</i> (bactéria)	0,86
<i>Candida albicans</i> (levedura)	0,87
<i>Aspergillus brasiliensis</i> (fungo)	0,77

Embora a determinação da atividade de água seja importante para avaliar o risco de contaminação, não deve ser usado como único indicativo para determinar se um produto necessita de um EEC. Fatores como a temperatura e o pH no processo de produção devem ser considerados [73].

- **pH da formulação:** os extremos de pH criam ambientes desfavoráveis ao crescimento microbiano, ou seja, pH muito ácidos (abaixo dos 3) e pH muito alcalinos (acima dos 10) evitam a proliferação de microrganismos que poderiam contaminar os produtos farmacêuticos.
- **Teor de álcool:** Álcoois como etanol e propilenoglicol são usados como solventes ou co-solventes. Produtos contendo percentagens de etanol superior a 20% não necessitam de ensaio de eficácia de conservantes [10]. Propilenoglicol é um álcool usado frequentemente em cremes e pomadas, que quando usado em uma concentração acima de 15%, possui atividade antimicrobiana significativa [78].
- **Substâncias que podem criar um ambiente hostil:** Determinados produtos têm presentes na sua formulação, ingredientes, excipientes ou substâncias ativas que possuem atividade antimicrobiana intrínseca que melhoram a eficácia antimicrobiana do produto formulado, permitindo minimizar a quantidade de conservante necessário para proteger o produto [8].

Para gerar dados mais conclusivos acerca das propriedades antimicrobianas dessas substâncias, recorre-se a dados históricos do produto, desenho experimental ou a referências bibliográficas:

- Agentes oxidantes fortes (como, o peróxido de hidrogénio) ou agentes redutores fortes (como os compostos de tiol) [10];
- Solventes orgânicos polares (como o acetato de etilo) [10];
- Colorantes oxidantes (por exemplo, corantes capilares) [10];
- Quantidades acima de 25% de clorohidrato de alumínio e sais [10];
- Gases propelentes como o isobutano, que permite fornecer uma segurança ao produto, uma vez que o crescimento microbiano é dificultado pela queda de pressão parcial do oxigénio [10];
- Agentes quelantes como o EDTA, que quando combinado com outros conservantes, possui propriedades antimicrobianas [79];
- A presença de antibióticos pode afetar o crescimento de microrganismo, no entanto, não devem ser usados como conservantes [80];
- Percentagens superiores a 85% de açúcar [81]

- Substâncias ativas com alguma atividade antimicrobiana, tais como o Ibuprofeno [82, 83]. Existe uma tendência para reduzir as concentrações de conservantes antimicrobianos. Uma vez que determinadas substâncias apresentam atividade antimicrobiana quando usados em determinada quantidade, tem sido uma necessidade demonstrar que a própria substância ativa é eficaz.
- **Embalagem:** Funciona como uma barreira física protetora do meio exterior. Desempenha um papel importante contra a contaminação durante o uso do produto por parte do consumidor. Produtos pressurizados, acondicionamento *airless*, embalagens unidose e válvulas unidirecionais asseguram a proteção do produto [10, 73].
- **Condições de produção:** certos aspetos no processo de produção podem reduzir o risco microbiológico do produto, nomeadamente, as altas temperaturas. Quando a temperatura de enchimento é superior a 65°C, o produto não necessita de um EEC [10].
- **Combinação de vários fatores:** A combinação dos fatores acima referidos pode criar um ambiente adverso ao crescimento ou sobrevivência de microrganismos [10, 73].

Alguns exemplos de produtos considerados de baixo risco microbiológico, atendendo aos fatores mencionados anteriormente, encontram-se na tabela 2.17.

Tabela 2.17-Exemplos de produtos de baixo risco microbiológico [10, 76, 78, 81],

Parâmetro	Gama	Exemplo
pH	≤ 3	<i>Peeling</i> facial (ácido glicólico)
	≥ 10	Produtos para moldar cabelo
Teor de álcool (etanol ou outro álcool)	$\geq 20\%$	Perfumes, Sprays de cabelo
Teor de propilenoglicol	$\geq 15\%$	Pomadas e cremes
Teor de açúcar	$\geq 85\%$	Xaropes
Temperatura de enchimento	$\geq 65^{\circ}\text{C}$	Bálsamo para lábios, batons, <i>blushes</i> em creme
Atividade de água (a_w)	$\leq 0,75$	
Produtos à base de solventes	-	Esmalte de unhas
Produtos oxidantes	-	Tintas para cabelos
Clorohidrato de alumínio	$\geq 25\%$	Anti-transpirantes

3. Materiais e Métodos

Na tabela 3.1 encontram-se todos os produtos que foram submetidos aos Ensaios de Eficácia de Conservantes assim como as informações mais relevantes dos mesmos.

3.1. Produtos

Tabela 3.1- Informações sobre os produtos submetidos aos Ensaios de Eficácia de Conservantes

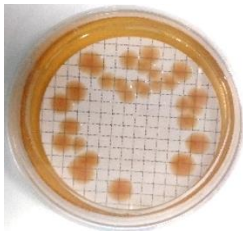
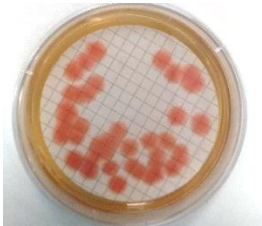
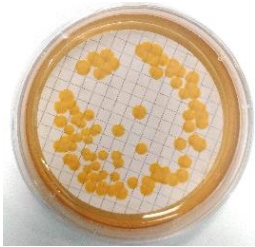


Produto	Tipo de produto	Componentes mais relevantes	Escala de fabrico
Ibuprofeno suspensão oral	Medicamento (Suspensão oral)	<ul style="list-style-type: none"> 100% API (Ibuprofeno) + 100%, 90%, 80%, 50% e 0% conservante (Benzoato de sódio) 80%, 50% e 20% API (Ibuprofeno) + 0% conservante (Benzoato de sódio) 	Lote laboratorial
Creme muda fraldas	Cosmético (Creme)	<ul style="list-style-type: none"> Conservante (<i>O-cymen-5-ol</i>) 	Lote industrial (início do prazo de validade)
Pomada de óxido de zinco	Medicamento (Emulsão)	<ul style="list-style-type: none"> Conservantes (Metilparabeno-Propilparabeno) 	Lote industrial (final do prazo de validade)
Paracetamol solução oral	Medicamento (Solução oral)	<ul style="list-style-type: none"> Conservantes (Metilparabeno+Propilparabeno) 	Lote industrial (início do prazo de validade)
Suplemento vitamínico	Suplemento (Solução oral)	<ul style="list-style-type: none"> Conservantes (Sorbato de potássio+ Benzoato de sódio) 	Lote industrial (final do prazo de validade)
Shampoo anti queda	Cosmético (Solução tópica)	<ul style="list-style-type: none"> Teor de álcool: 10% e 20% Sem conservantes 	Lote piloto
Medicamento para a tosse	Medicamento (Solução oral)	<ul style="list-style-type: none"> Sorbitol a 70% (álcool) Sem conservantes 	Lote industrial (final do prazo de validade)

Notas: ¹As amostras dos produtos usados nos ensaios foram facultados para a realização dos mesmos; ²Todos os produtos referidos na tabela foram analisados pelo próprio autor desta dissertação, à exceção do medicamento para a tosse, que foi analisado tanto pelo próprio autor como por um analista de microbiologia.

3.2. Estirpes de microrganismos

Na tabela 3.2 estão representadas as pastilhas das estirpes de microrganismos utilizados nos Ensaio de Eficácia de Conservantes.

Tabela 3.2- Estirpes de referência utilizadas nos Ensaio de Eficácia de Conservantes

Microrganismos padrão	
Bactérias	<p><i>Escherichia coli</i> ATCC 8739¹</p> 
	<p><i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027¹</p> 
	<p><i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538¹</p> 
Levedura	<p><i>Candida albicans</i> ATCC 10231¹</p> 
Fungo	<p><i>Aspergillus brasiliensis</i> ATCC 16404¹</p> 
¹ Referência de identificação da estirpe	

3.3. Reagentes

Na tabela 3.3 encontram-se todos os reagentes que foram utilizados na preparação dos meios de cultura sólidos, soluções e agentes emulsionantes.

Tabela 3.3- Reagentes utilizados para preparação dos meios de cultura, soluções e agentes emulsionantes

Reagentes	Fornecedor
<i>Sabouraud Dextrose Agar (SDA)</i>	<i>Biokar diagnostics</i>
<i>Trypticase Soy Agar (TSA)</i>	<i>Biokar diagnostics</i>
<i>Potato Dextrose Agar (PDA)</i>	<i>Biokar diagnostics</i>
Solução peptona tamponada com cloreto de sódio pH 7 (APT)	<i>Biokar diagnostics</i>
Solução Eugon LT 100 (Eugon)	<i>Biokar diagnostics</i>
Caldo neutralizante <i>Dey-Engley</i> (DEB)	<i>CONDA pronadisa</i>
Polissorbato (<i>tween</i> ®) 80	Ds Produtos Químicos
Miristato de isopropilo	<i>BTC Specialty Chemicals</i>

Os meios de cultura sólidos e as soluções (APT, Eugon e DEB) são preparados de acordo com as instruções do fornecedor, dissolvendo os respectivos reagentes em água purificada. Como os meios de cultura sólidos (SDA, TSA e PDA) contêm agar na sua composição, são homogeneizados recorrendo a agitação magnética. As soluções de APT e Eugon são agitados manualmente, uma vez que são utilizados como meios líquidos. O meio neutralizante DEB é homogeneizado recorrendo à agitação com aquecimento. Estes meios são posteriormente esterilizados na autoclave durante 15 minutos à temperatura de 121°C [55].

Os meios de cultura sólidos depois de estéreis e quando atingem os 40-45°C são transferidos para placas de *petri* para solidificarem. Estes são posteriormente armazenados a 5±3°C até serem utilizados com um prazo máximo de 1 mês após preparação (este prazo foi validado pelo laboratório Medinfar). Enquanto que os meios líquidos são guardados, à temperatura ambiente, num local protegido da luz.

O miristato de isopropilo é um líquido incolor que é esterilizado recorrendo à filtração.

3.4. Metodologia dos Ensaio de Eficácia de Conservantes

O procedimento foi realizado de acordo com os requisitos da farmacopeia europeia para medicamentos e suplementos alimentares e pela norma ISO 11930 para produtos cosméticos. O ensaio de eficácia de conservantes é realizado dentro de uma câmara de fluxo laminar (CFL) de modo a garantir que a contaminação realizada no ensaio é a mínima existente.

Antes de proceder ao EEC é necessário fazer a validação do método de neutralização (diluição e/ou a adição de solução neutralizante) mais adequado para cada produto. Esta escolha deverá permitir detetar os microrganismos presentes, simulando que se existir alguma contaminação no produto, a natureza do mesmo, as suas propriedades e principalmente os conservantes não inibem o seu crescimento. Para estas condições serem validadas, a taxa de recuperação microbiana tem de estar de acordo com os critérios definidos pela EP e pela norma ISO 11930 como representado na figura 3.1.

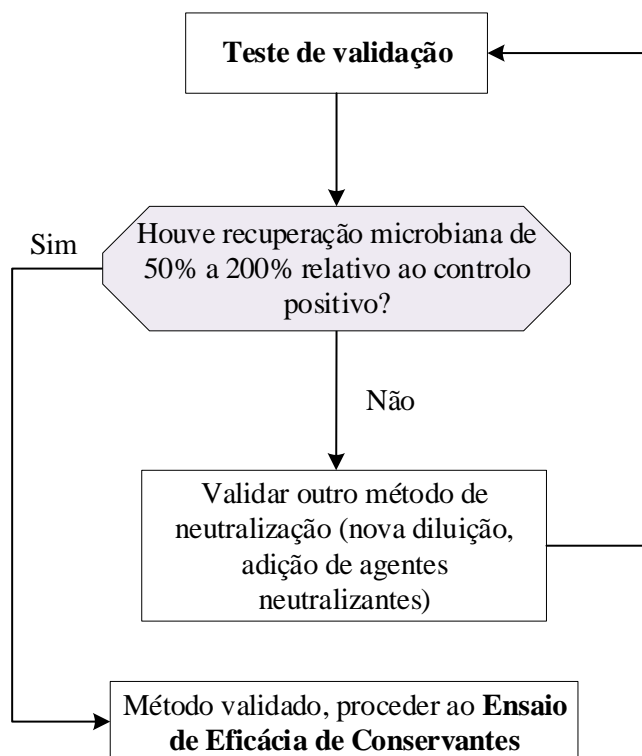


Figura 3.1-Diagrama de decisão da validação do método de neutralização.

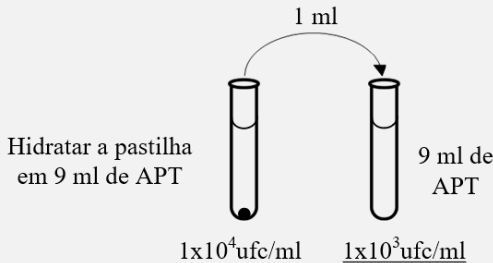
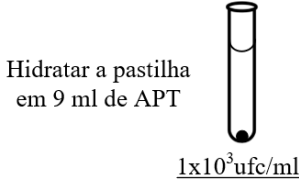
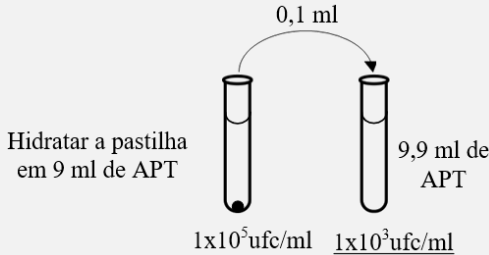
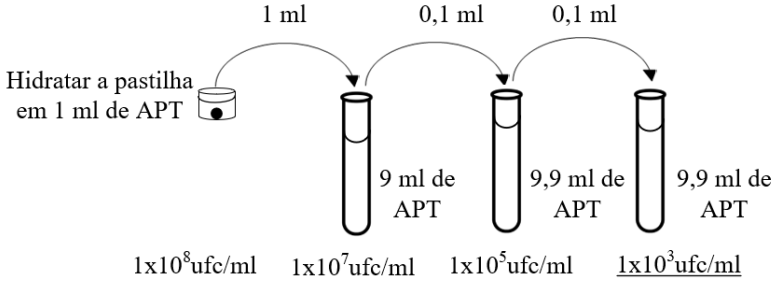
Tal como já foi referido o EEC tem duas fases:

- Parte I- Validação do método de neutralização da atividade antimicrobiana
- Parte II- Ensaio de Eficácia de Conservantes

Parte I- Validação do método de neutralização da atividade antimicrobiana

1. Preparação das suspensões de microrganismos até obter uma concentração microbiana de 1×10^3 ufc/ml para cada microrganismo. Na figura seguinte estão representadas as diluições realizadas recorrendo a água peptonada como fluido de hidratação.

Tabela 3.4- Preparação das suspensões microbianas para o teste de validação

Microrganismo de ensaio	Preparação das diluições necessárias até obter a concentração microbiana de 1×10^3 ufc/ml
Pastilha de <i>Escherichia coli</i> (Ec) na concentração 1×10^4 ufc	 <p>Hidratar a pastilha em 9 ml de APT</p> <p>1×10^4 ufc/ml 1×10^3 ufc/ml</p>
Pastilhas de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (Pa) e <i>Staphylococcus aureus</i> (Sa) na concentração 1×10^3 ufc	 <p>Hidratar a pastilha em 9 ml de APT</p> <p>1×10^3 ufc/ml</p>
Pastilha de <i>Candida albicans</i> (Ca) na concentração 1×10^5 ufc	 <p>Hidratar a pastilha em 9 ml de APT</p> <p>1×10^5 ufc/ml 1×10^3 ufc/ml</p>
Pastilha de <i>Aspergillus brasiliensis</i> (Ab) na concentração 1×10^8 ufc	 <p>Hidratar a pastilha em 1 ml de APT</p> <p>1×10^8 ufc/ml 1×10^7 ufc/ml 1×10^5 ufc/ml 1×10^3 ufc/ml</p>
Nota: Volume de fluido de hidratação (APT) é utilizado de acordo com o certificado do fornecedor	

2. Preparação do controlo positivo utilizando imediatamente as suspensões microbianas preparadas inicialmente com uma concentração de 1×10^3 ufc/ml. Este controlo é realizado para comprovar a eficiência da neutralização da atividade antimicrobiana.

O controlo positivo é composto por 1 ml de cada suspensão microbiana (um tubo de ensaio para cada microrganismo) diluído em 10 ml de uma solução tampão ou neutralizante (APT e Eugon respetivamente), de modo a obter no máximo 100 ufc/ml. Agitar para homogeneizar.

3. Preparação das amostras testes utilizando as mesmas suspensões microbianas na concentração de 1×10^3 ufc/ml, até obter uma concentração microbiana de 1×10^2 ufc no produto. Agitar para garantir a distribuição homogénea. As diluições e o tipo de neutralizante utilizado depende do tipo de produto em análise.

As soluções e suspensões orais são produtos fáceis de homogeneizar. No entanto, nos produtos insolúveis em água, como o creme muda fraldas e a pomada de Óxido de Zinco, é necessário recorrer a alguns passos adicionais para garantir a melhor homogeneização possível. No caso do creme muda fraldas foi adicionado *tween*® 80 à amostra do produto e para diluir a amostra utilizou-se o meio Eugon suplementado com 5% de *tween*® 80. Para a pomada foram testadas diferentes formas de homogeneização que se encontram esquematizadas na figura 3.2.

4. Filtração por membrana dos controlos negativos dos solventes utilizados (APT e Eugon), do controlo positivo e das 5 amostras inoculadas com os 5 microrganismos em estudo. A filtração é feita recorrendo a uma rampa de filtração ligada a um sistema de vácuo através de um recipiente de esgoto. Colocam-se os copos esterilizados na rampa de filtração e antes de iniciar a filtração colocam-se as membranas de celulose nos copos com uma pinça estéril ou descartável. É utilizado um copo de filtração para cada microrganismo em análise. As etapas da filtração encontram-se esquematizadas na figura 3.4.
5. Incubação das placas de agar a 30-35°C ou 20-25°C consoante o microrganismo, durante 3 dias para bactérias e 5 dias para fungos.
6. Contagem do número de colónias após o tempo de incubação e cálculo da taxa de recuperação microbiana das amostras inoculadas quando comparadas com o controlo positivo.

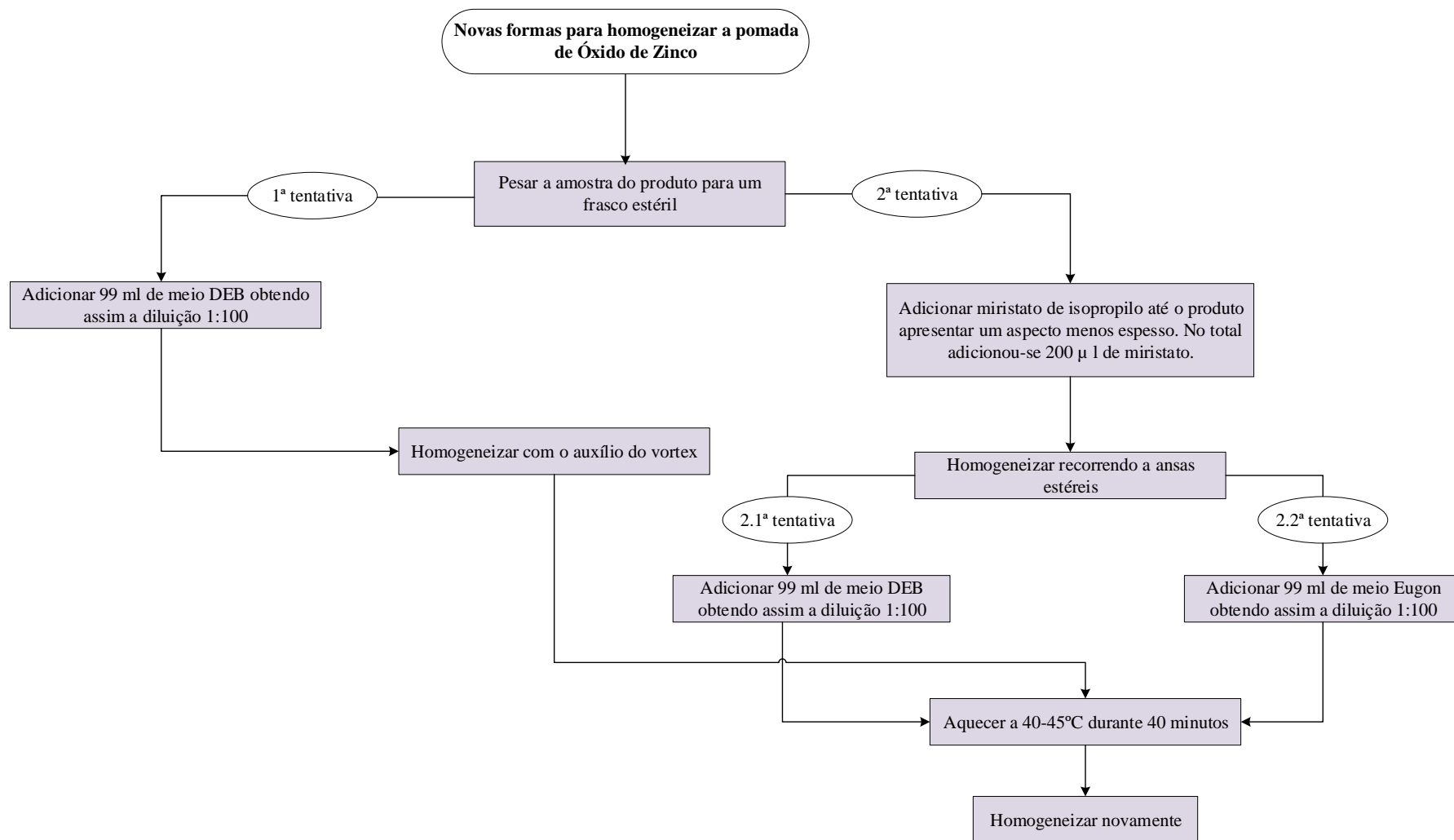


Figura 3.2-Testes efetuados para tentar homogeneizar a pomada de Óxido de Zinco

Parte II- Ensaio de Eficácia de Conservantes (EEC)

Após ser selecionado método de neutralização mais adequado, estão reunidas as condições necessárias para proceder ao EEC. O procedimento para o Ensaio de Eficácia de Conservantes encontra-se descrito na figura 3.3.

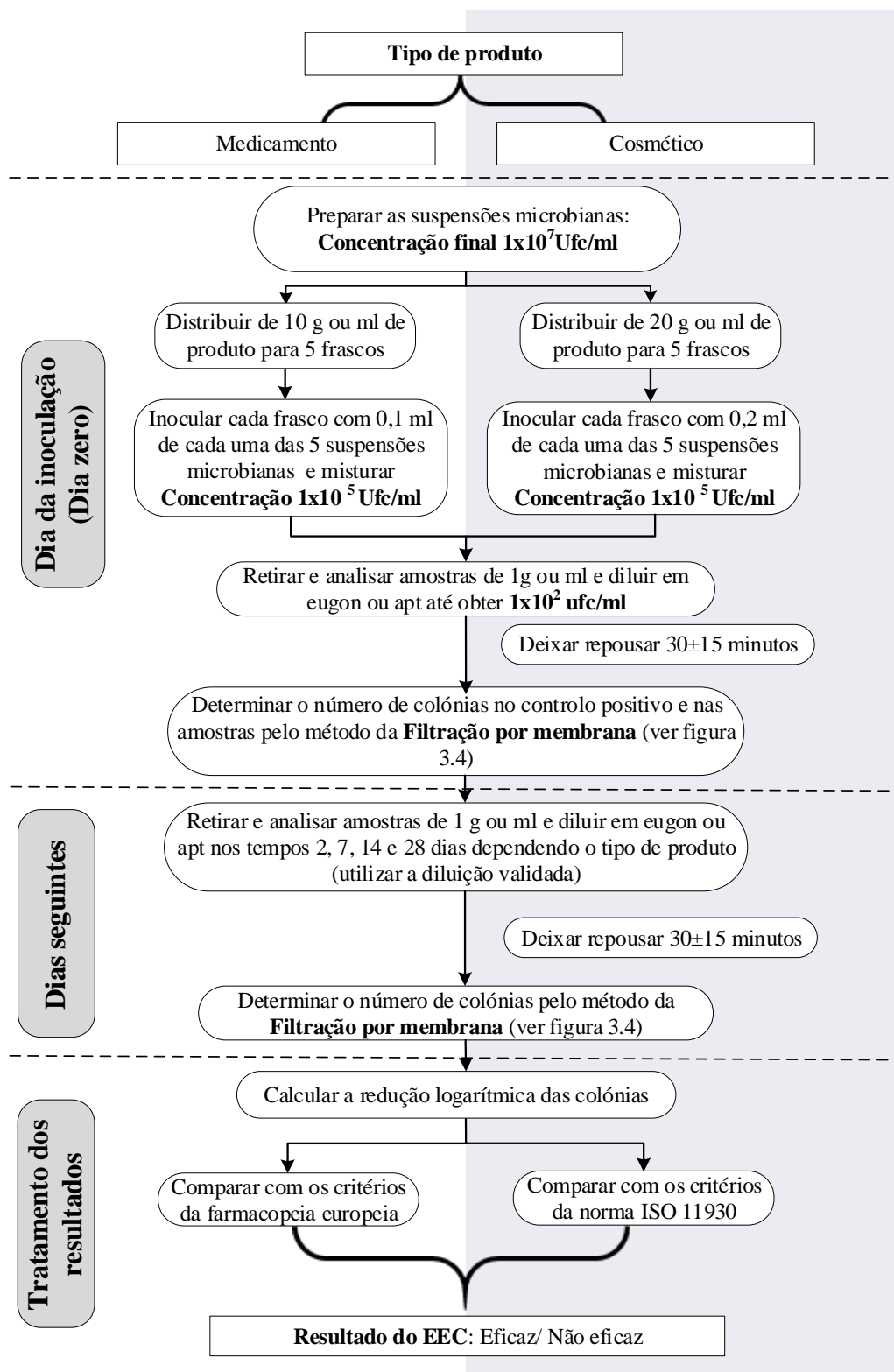


Figura 3.3- Etapas do Ensaio de Eficácia de Conservantes para medicamentos e cosméticos

A realização da filtração por membrana (passo 6 da figura 3.3) envolve as etapas representadas na figura 3.4.

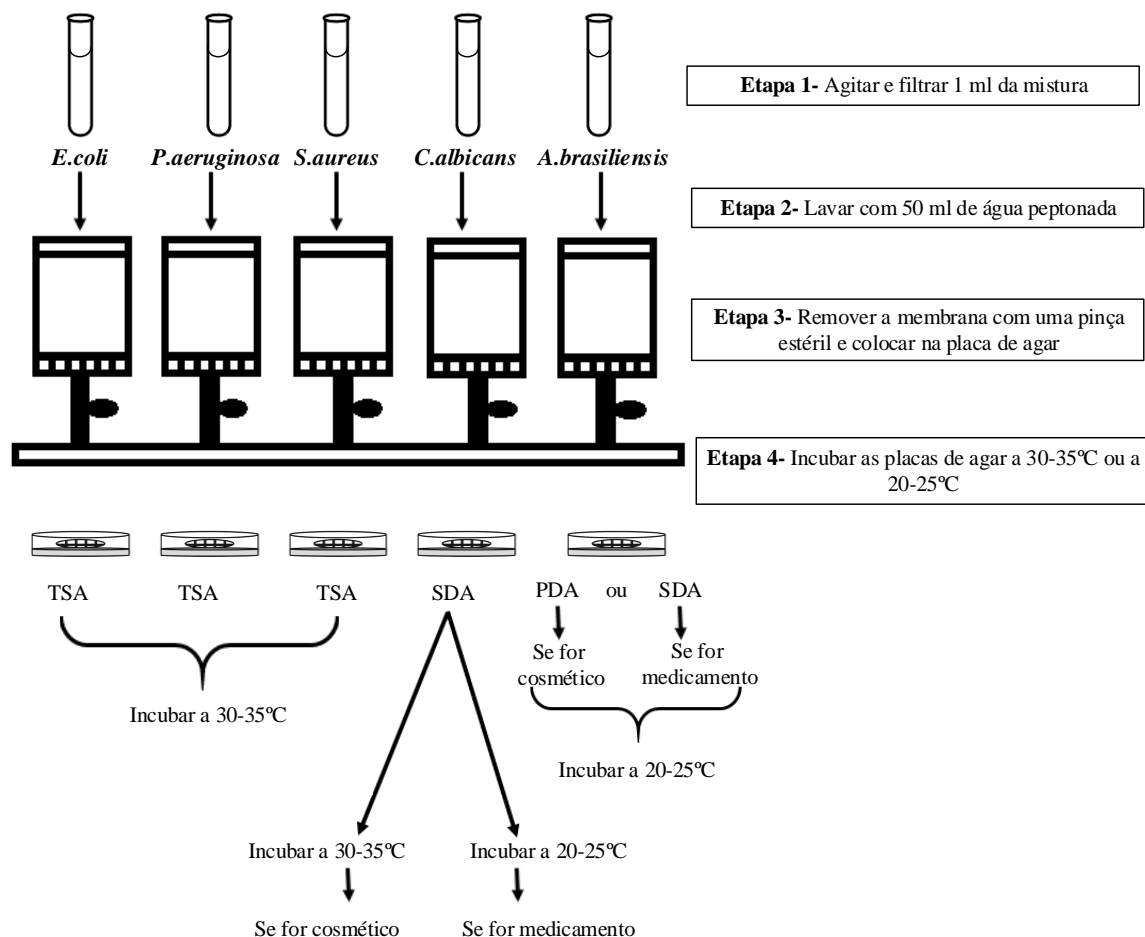


Figura 3.4-Etapas realizadas na filtração por membrana

A contagem do número de microrganismos sobreviventes no tempo zero dias serve para garantir que houve a contaminação do produto com as 5 estirpes de microrganismos (*E.coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *C. albicans* e *A. brasiliensis*), sendo considerada uma contagem apenas informativa.

Como controlo positivo, preparou-se tubos de ensaio com 9 ml de solução neutralizante (APT ou Eugon) inoculados com as suspensões de microrganismos em teste (com a concentração de 1×10^2 ufc/ml) e filtrou-se 1 ml. Este controlo positivo é apenas realizado no tempo inicial do ensaio. Para os controlos negativos foram preparadas placas com os meios de cultura utilizados, com Eugon e APT.

A figura 3.5 indica os tempos que as amostras contaminadas com bactérias e fungos têm de ser avaliadas quanto à eficácia antimicrobiana, consoante o tipo de formulação que se pretende analisar. Neste trabalho apenas se fez EEC em medicamentos orais e tópicos e cosméticos.

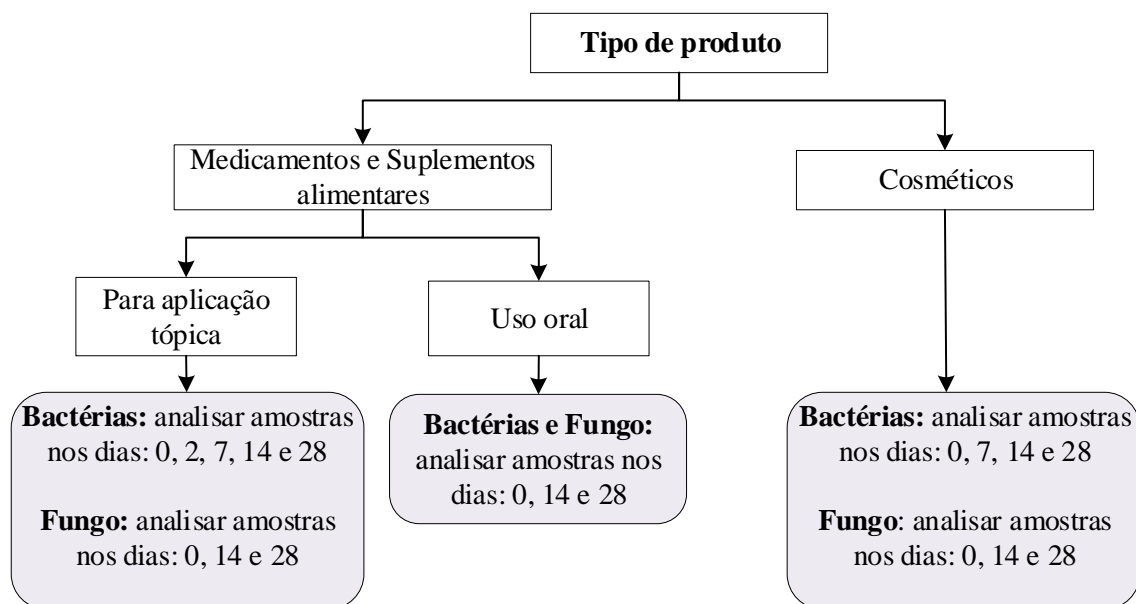


Figura 3.5-Tempos de amostragem segundo o tipo de formulação do produto

Como já foi referido anteriormente, para os produtos mais espessos (creme muda fraldas e pomada de Óxido de Zinco), foi necessário recorrer a passos adicionais antes da inoculação das suspensões microbianas e/ou recorrer a outros fluidos neutralizantes para diluir as alíquotas retiradas. Isto porque, tem de se garantir a distribuição uniforme dos microrganismos em toda a amostra. Foram utilizados como meios neutralizantes, o Eugon, o Eugon suplementado com 5% de tween® 80 e o meio DEB. O meio DEB é semelhante ao Eugon mas possui uma maior quantidade de lecitina e ainda outras substâncias inibidoras como o tiossulfato de sódio e o tioglicolato de sódio. Foram ainda testadas outras substâncias como o *tween*® 80 e o miristato de isopropilo esterilizado por filtração.

4. Discussão de resultados

4.1. Análise da eficácia de diferentes concentrações de conservante no produto Ibuprofeno suspensão oral

Para determinar a concentração mínima eficaz de conservante no Ibuprofeno suspensão oral, foram preparados lotes laboratoriais³ com diferentes concentrações de benzoato de sódio (50%, 80%, 90% e 100% relativamente ao valor pretendido para a formulação em causa) e submetido a ensaios de eficácia de conservantes.

Antes de proceder aos EEC, foi realizado um teste de validação para demonstrar a eficácia do método de neutralização selecionado (diluição + solução neutralizante). Neste caso foi utilizada a solução neutralizante Eugon por ser um meio enriquecido com substâncias inibidoras (lecitina e *tween*® 80) e com um agente dispersante (*octoxinol* 9).

Para as formulações com 50% e 100% da concentração pretendida de conservante, foram testadas as diluições 1:10 e 1:100 em Eugon. Para o método se considerar validado, tem de haver uma taxa de recuperação microbiana de 50% a 200% do microrganismo inoculado (controlo positivo).

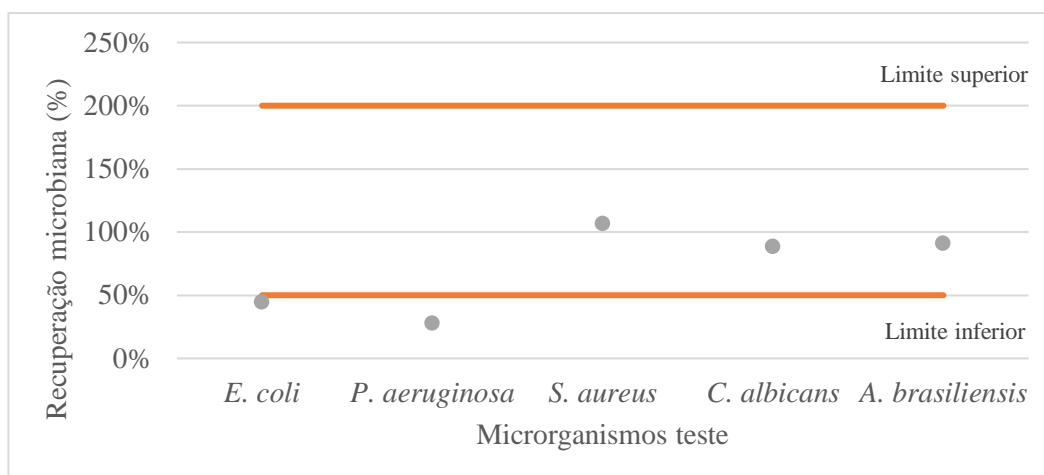
Na figura 4.1 encontram-se os resultados da recuperação dos 5 microrganismos para a formulação com 100% conservante testando as diluições 1:10 (a) e 1:100 (b) em Eugon. Verifica-se que utilizando uma diluição 1:10, a taxa de recuperação das estirpes *E. coli* e *P. aeruginosa* não está dentro do intervalo admissível, mas a diluição 1:100 permitiu obter uma taxa de recuperação dentro do limite aceitável. Estes resultados indicam que o EEC terá de ser realizado fazendo uma diluição 1:100 em Eugon.

Os resultados da formulação do produto com uma concentração de 50% de conservante estão representados na figura 4.2. Tal como a formulação com 100% de conservante, a diluição validada foi a 1:100 em Eugon.

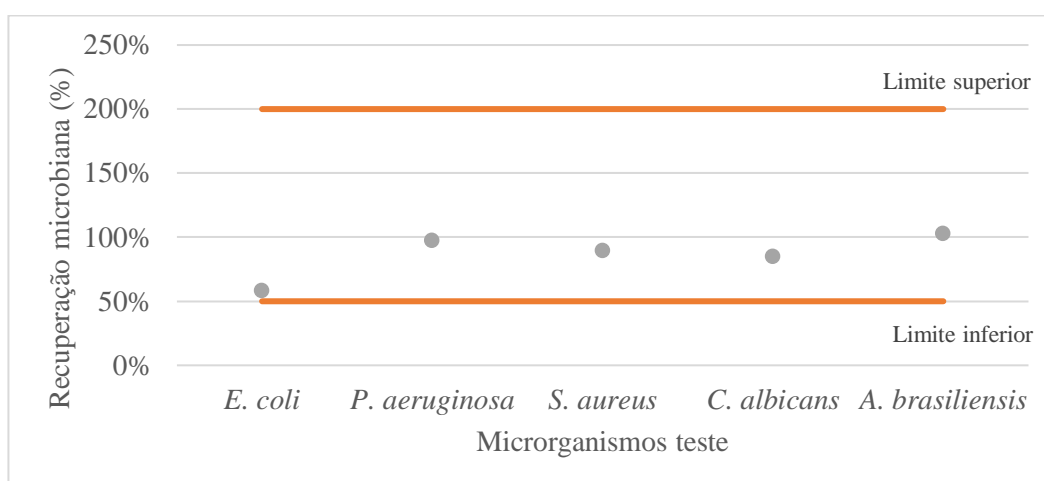
Para as formulações com 80% e 90% de concentração de conservante foi testada apenas a diluição 1:100 em Eugon, uma vez que foi a diluição validada para as formulações com as concentrações máxima e mínima de conservante. Nas figuras 4.3 e 4.4 seguintes estão os resultados obtidos testando estas diluições.

As contagens microbianas obtidas nos controlos positivos e nas diferentes formulações do produto, necessárias para cálculo da taxa de recuperação, encontram-se no anexo A (tabelas A1 a A4).

³ A preparação dos lotes laboratoriais não foi no âmbito desta dissertação.



(a)



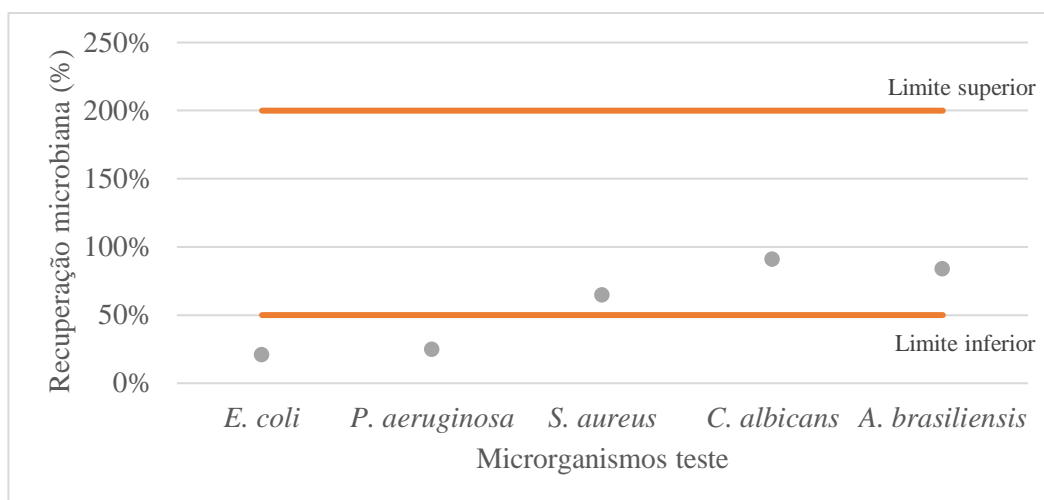
(b)

Figura 4.1- Resultado da recuperação microbiana no ibuprofeno com concentração de 100% conservante testando:(a) diluição 1:10 em Eugon;(b) diluição 1:100 em Eugon

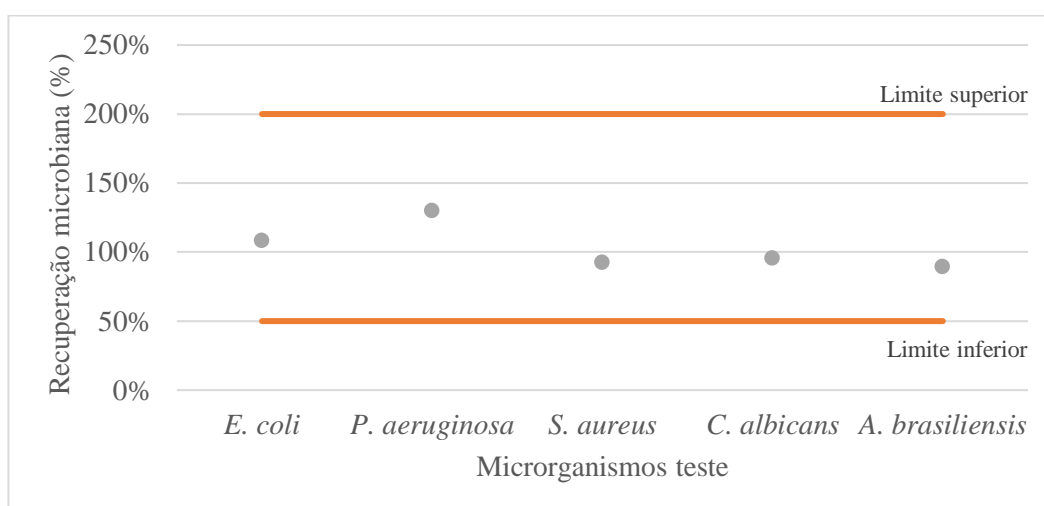
Depois de o método ser validado, procedeu-se à realização dos Ensaio de Eficácia de Conservantes. Os resultados da contagem do número de microrganismos sobreviventes nas diferentes formulações testadas encontram-se na tabela 4.1.

Verifica-se que para todas as formulações, não foram detetadas colónias de bactérias (*E.coli*, *P. aeruginosa* e *S. aureus*) e de levedura (*C. albicans*) logo no primeiro dia do ensaio, enquanto que para o fungo (*A. brasiliensis*) observa-se contagens de colónias. Mas é a formulação sem conservante que aponta para a possibilidade de outros componentes da formulação apresentarem propriedades antimicrobianas, nomeadamente, a própria substância ativa (ibuprofeno). Na secção 4.2. deste relatório será analisado a atividade antimicrobiana do ibuprofeno em função da sua concentração.

Após registados os resultados das contagens de ufc, estes foram convertidos em \log_{10} e calculou-se a sua redução logarítmica. As reduções logarítmicas encontram-se representadas na tabela 4.2.



(a)



(b)

Figura 4.2- Resultado da recuperação microbiana no ibuprofeno com concentração de 50% conservante testando:(a) diluição 1:10 em Eugon;(b) diluição 1:100 em Eugon

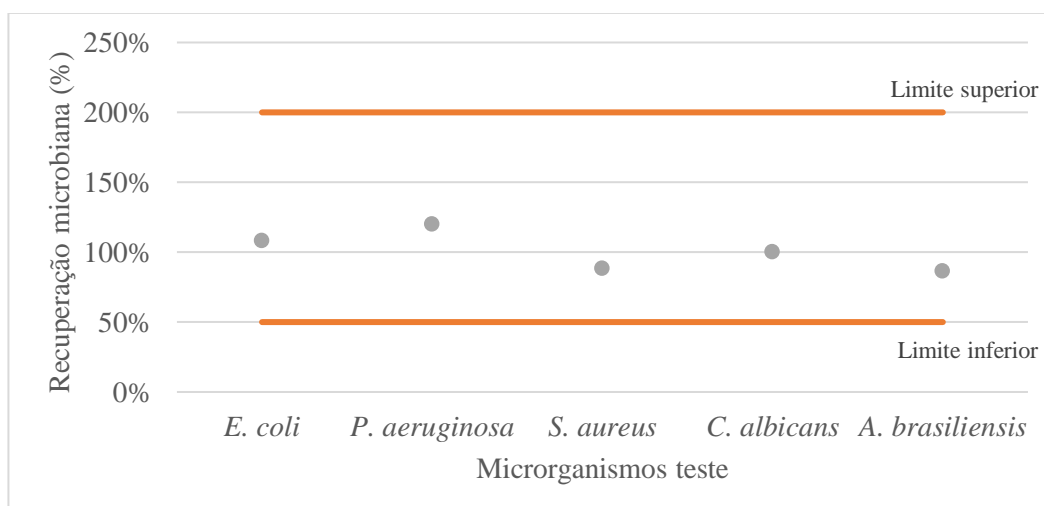


Figura 4.3- Resultado da recuperação microbiana no ibuprofeno com concentração de 80% conservante testando a diluição 1:100 em Eugon

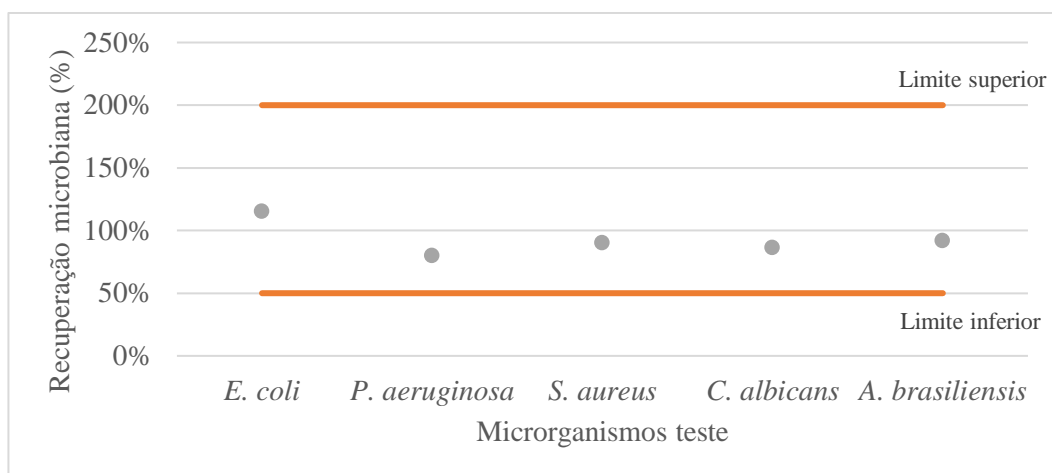


Figura 4.4- Resultado da recuperação microbiana no ibuprofeno com concentração de 90% de conservante testando a diluição 1:100 em Eugon

Tabela 4.1- Resultados do Ensaio de Eficácia de Conservantes ao longo dos 28 dias para o Ibuprofeno suspensão oral com diferentes percentagens de conservante

		Inóculo		Contagem dos microrganismos sobreviventes no produto				
				Dia 0 ¹	Dia 14		Dia 28	
Formulação (% de conservante)	Microrganismo	ufc/ml	Log ₁₀	ufc/ml	ufc/ml	Log ₁₀	ufc/ml	Log ₁₀
0%conservante	<i>E. coli</i>	8,1x10 ⁵	5,9	0	0	-	0	-
	<i>P. aeruginosa</i>	5,8 x10 ⁵	5,8	0	0	-	0	-
	<i>S. aureus</i>	7,5 x10 ⁵	5,9	0	0	-	0	-
	<i>C. albicans</i>	8,1 x10 ⁵	5,9	0	0	-	0	-
	<i>A.brasiliensis</i>	3,3 x10 ⁵	5,5	2,4 x10 ⁵	1,0 x10 ³	3	1,6 x10 ³	3,2
50% conservante	<i>E. coli</i>	8,1 x10 ⁵	5,9	0	0	-	0	-
	<i>P. aeruginosa</i>	5,8 x10 ⁵	5,8	0	0	-	0	-
	<i>S. aureus</i>	7,5 x10 ⁵	5,9	0	0	-	0	-
	<i>C. albicans</i>	8,1 x10 ⁵	5,9	0	0	-	0	-
	<i>A.brasiliensis</i>	3,3 x10 ⁵	5,5	2,9 x10 ⁵	2,0 x10 ²	2,3	1,0 x10 ³	3,0
80% conservante	<i>E. coli</i>	8,7 x10 ⁵	5,9	0	0	-	0	-
	<i>P. aeruginosa</i>	7,8 x10 ⁵	5,9	0	0	-	0	-
	<i>S. aureus</i>	9,9 x10 ⁵	6,0	0	0	-	0	-
	<i>C. albicans</i>	8,6 x10 ⁵	5,9	0	0	-	0	-
	<i>A.brasiliensis</i>	7,2 x10 ⁵	5,9	3,9 x10 ⁵	1,0 x10 ²	2,0	1,0 x10 ²	2,0
90% conservante	<i>E. coli</i>	8,1 x10 ⁵	5,9	0	0	-	0	-
	<i>P. aeruginosa</i>	5,8 x10 ⁵	5,8	0	0	-	0	-
	<i>S. aureus</i>	7,5 x10 ⁵	5,9	0	0	-	0	-
	<i>C. albicans</i>	8,1 x10 ⁵	5,9	0	0	-	0	-
	<i>A. brasiliensis</i>	3,3 x10 ⁵	5,5	2,6 x10 ⁵	0	-	0	-
100% conservante	<i>E. coli</i>	9,8 x10 ⁵	6,0	0	0	-	0	-
	<i>P. aeruginosa</i>	9,0 x10 ⁵	6,0	0	0	-	0	-
	<i>S. aureus</i>	1,1 x10 ⁶	6,0	0	0	-	0	-
	<i>C. albicans</i>	8,8 x10 ⁵	5,9	0	0	-	0	-
	<i>A.brasiliensis</i>	4,7 x10 ⁵	5,7	3,0 x10 ⁵	0	-	0	-

¹As contagens de colônias obtidas no 1º dia do ensaio (dia zero) são resultados meramente informativos

¹As contagens de colónias obtidas no 1º dia do ensaio (dia zero) são resultados meramente informativos

Tabela 4.2- Resultados das reduções logarítmicas para o ibuprofeno com diferentes concentrações de conservante

Formulação (% de conservante)	Microrganismo	Redução log ₁₀		Resultado	
		Da contagem inicial até ao 14º dia	Do tempo anterior até ao 28º dia	Resultado por microrganismo	Resultado final do EEC
0% conservante	<i>E. coli</i>	5,9	NA ¹	Eficaz	Não eficaz
	<i>P. aeruginosa</i>	5,8	NA	Eficaz	
	<i>S. aureus</i>	5,9	NA	Eficaz	
	<i>C. albicans</i>	5,9	NA	Eficaz	
	<i>A. brasiliensis</i>	2,5	-0,2 ²	Não eficaz	
50% conservante	<i>E. coli</i>	5,9	NA	Eficaz	Não eficaz
	<i>P. aeruginosa</i>	5,8	NA	Eficaz	
	<i>S. aureus</i>	5,9	NA	Eficaz	
	<i>C. albicans</i>	5,9	NA	Eficaz	
	<i>A. brasiliensis</i>	3,2	-0,7 ²	Não eficaz	
80% conservante	<i>E. coli</i>	5,9	NA	Eficaz	<u>Eficaz</u>
	<i>P. aeruginosa</i>	5,9	NA	Eficaz	
	<i>S. aureus</i>	6,0	NA	Eficaz	
	<i>C. albicans</i>	5,9	NA	Eficaz	
	<i>A. brasiliensis</i>	3,9	NA	Eficaz	
90% conservante	<i>E. coli</i>	5,9	NA	Eficaz	<u>Eficaz</u>
	<i>P. aeruginosa</i>	5,8	NA	Eficaz	
	<i>S. aureus</i>	5,9	NA	Eficaz	
	<i>C. albicans</i>	5,9	NA	Eficaz	
	<i>A. brasiliensis</i>	5,5	NA	Eficaz	
100% conservante	<i>E. coli</i>	6,0	NA	Eficaz	<u>Eficaz</u>
	<i>P. aeruginosa</i>	6,0	NA	Eficaz	
	<i>S. aureus</i>	6,0	NA	Eficaz	
	<i>C. albicans</i>	5,9	NA	Eficaz	
	<i>A. brasiliensis</i>	5,7	NA	Eficaz	

¹ NA- nenhum aumento quando comparado com o tempo anterior
²Valores negativos representam crescimento logarítmico em vez de redução logarítmica

Foram seguidos os critérios estabelecidos no capítulo 5.1.3. da farmacopeia europeia, específicos para preparações orais. A farmacopeia europeia recomenda que:

- Para bactérias: deve haver uma redução logarítmica de 3 relativamente ao valor do inóculo no 14º dia e nenhum aumento logarítmico no 28º quando comparado com o 14º dia;
- Para fungos: uma redução logarítmica de 1 relativamente ao valor do inóculo no 14º dia e nenhum aumento logarítmico no 28º dia quando comparado com o 14º dia.

As formulações com concentração de 0% e 50% de conservante não se mostraram eficazes para o fungo *A. brasiliensis*, uma vez que no 28º dia houve um crescimento logarítmico de 0,2 e

0,7, respetivamente. Por isso estas formulação não foram consideradas eficazes. Enquanto que as formulações com concentrações de 100%, 90% e 80% conservante cumprem com todos os critérios de aceitação e por isso são consideradas concentrações eficazes. Assim sendo, a concentração mínima eficaz de benzoato de sódio neste produto foi de 80% relativo ao valor pretendido inicialmente.

4.2. Análise da ação antimicrobiana do Ibuprofeno suspensão oral com diferentes concentrações de ibuprofeno

Existem substâncias ativas que têm propriedades antimicrobianas. Para demonstrar que o ibuprofeno presente no produto Ibuprofeno suspensão oral tem alguma atividade antimicrobiana, foram testadas diferentes concentrações de API, relativamente ao valor pretendido para a formulação final (80%, 50% e 20%) e sem adição de conservantes. Desta forma pretendeu-se analisar a partir de que concentração, o ibuprofeno poderá ser capaz de inibir o crescimento de determinados microrganismos. Na tabela 4.3 estão os resultados do EEC para as diferentes formulações.

Tabela 4.3- Resultados do Ensaio de Eficácia de Conservantes ao longo dos 28 dias para o Ibuprofeno suspensão oral com diferentes quantidades de ibuprofeno

Formulação (% API)	Microrganismo	Inóculo		Contagem dos microrganismos sobreviventes no produto				
				Dia 0 ¹	Dia 14		Dia 28	
		ufc/ml	Log ₁₀	ufc/ml	ufc/ml	Log ₁₀	ufc/ml	Log ₁₀
80% API	<i>E. coli</i>	7,1 x10 ⁵	5,9	0	0	-	0	-
	<i>P. aeruginosa</i>	7,2 x10 ⁵	5,9	0	0	-	0	-
	<i>S. aureus</i>	1,6 x10 ⁶	6,2	0	0	-	0	-
	<i>C. albicans</i>	1,3 x10 ⁶	6,1	0	0	-	0	-
	<i>A. brasiliensis</i>	6,4 x10 ⁵	5,8	4,5x10 ⁵	1,6x10 ³	3,2	2,1x10 ³	3,3
50% API	<i>E. coli</i>	7,1 x10 ⁵	5,9	0	0	-	0	-
	<i>P. aeruginosa</i>	7,2 x10 ⁵	5,9	0	0	-	0	-
	<i>S. aureus</i>	1,6 x10 ⁶	6,2	0	0	-	0	-
	<i>C. albicans</i>	1,3 x10 ⁶	6,1	8,0x10 ⁴	0	-	0	-
	<i>A. brasiliensis</i>	6,4 x10 ⁵	5,8	5,8x10 ⁵	1,9x10 ³	3,3	3,0x10 ³	3,5
20% API	<i>E. coli</i>	7,1 x10 ⁵	5,9	0	0	-	0	-
	<i>P. aeruginosa</i>	7,2 x10 ⁵	5,9	0	0	-	0	-
	<i>S. aureus</i>	1,6 x10 ⁶	6,2	0	0	-	0	-
	<i>C. albicans</i>	1,3 x10 ⁶	6,1	1,0x10 ⁵	0	-	0	-
	<i>A. brasiliensis</i>	6,4 x10 ⁵	5,8	5,2x10 ⁵	2,7x10 ³	3,4	4,2x10 ³	3,6

¹As contagens de colónias obtidas no 1º dia do ensaio (dia zero) são resultados meramente informativos

Analisando a tabela 4.3, verifica-se que à medida que a concentração de ibuprofeno diminui há um aumento da recuperação dos microrganismos inoculados, o que demonstra alguma atividade antimicrobiana deste API. A formulação com 80% de ibuprofeno não teve nenhuma recuperação de *C. albicans*, no entanto, com 50% de ibuprofeno, obteve-se uma recuperação de $8,0 \times 10^4$ ufc/ml relativamente a este microrganismo inoculado.

Como já era expectável, em todas as formulações houve recuperação do fungo *A. brasiliensis*, uma vez que na formulação com 100% de ibuprofeno e 0% de conservante, analisada na secção 4.1, já se recuperava uma certa quantidade deste microrganismo.

Relativamente às bactérias, mesmo a formulação com menor concentração de ibuprofeno (20% API) não houve recuperação de nenhuma das bactérias (*E. coli*, *P. aeruginosa* e *S. aureus*), significando que houve uma ação antibacteriana nas amostras inoculadas, ou seja, essa concentração de ibuprofeno continua a ser eficaz contra estas bactérias.

4.3. Análise da eficácia antimicrobiana do shampoo anti queda de cabelo

Segundo a norma ISO 29621, os produtos que têm na sua composição um teor de álcool superior a 20%, são considerados produtos pouco suscetíveis ao crescimento microbiano [84]. Foi realizado um estudo de maneira a comprovar que a presença de álcool em determinada quantidade contribui para a eficácia antimicrobiana, não sendo necessário a inclusão de conservantes.

O shampoo em teste possui na sua formulação, 20% de álcool. Pretendeu-se estudar como seria o comportamento do produto a nível de eficácia antimicrobiana, se ocorresse evaporação do álcool ao longo do PV do mesmo. Admitindo uma evaporação de etanol para metade da quantidade inicial, foi formulado um lote laboratorial com 10% álcool e submetido aos Ensaio de Eficácia de Conservantes.

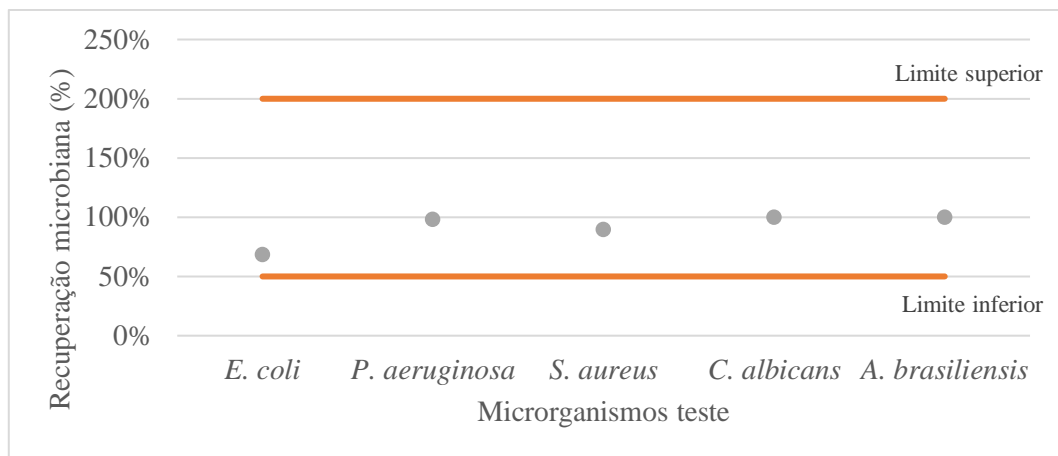
Nos métodos de neutralização testados para a formulação com 20% álcool usou-se as diluições 1:100 e 1:1000 em solução neutralizante (Eugon). Os resultados das taxas de recuperação estão representados na figura 4.5.

Verifica-se que ambas as diluições testadas cumprem os critérios definidos, no entanto, optou-se pela menor diluição possível (1:100), permitindo obter um resultado com um menor erro.

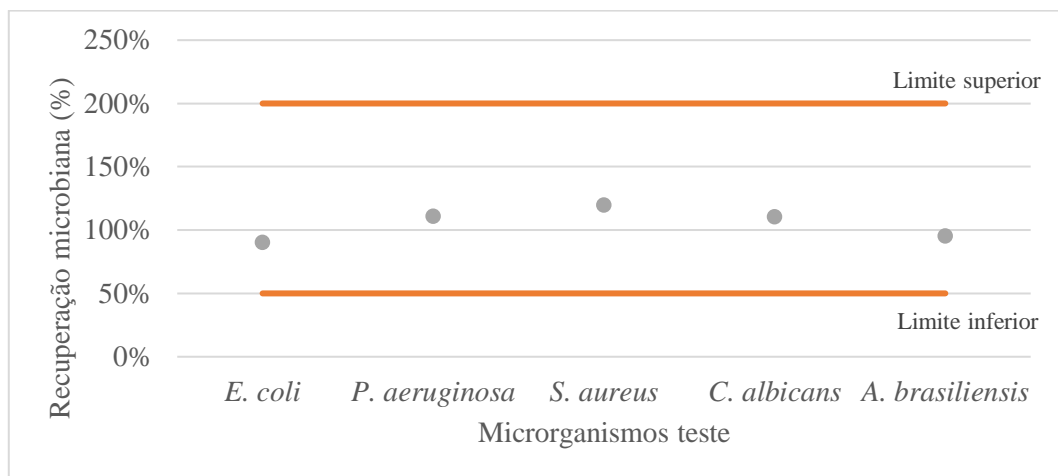
Para a formulação com 10% álcool foi testada a diluição 1:100 em Eugon. Os resultados desta validação estão na figura 4.6.

As respetivas contagens microbianas obtidas para estas duas formulações encontram-se no anexo A (tabelas A5 e A6).

Os resultados dos EEC realizados estão representados na tabela 4.4.



(a)



(b)

Figura 4.5- Resultado da recuperação microbiana no shampoo com 20% de álcool testando: (a) diluição 1:100 em Eugon; (b) diluição 1:1000 em Eugon

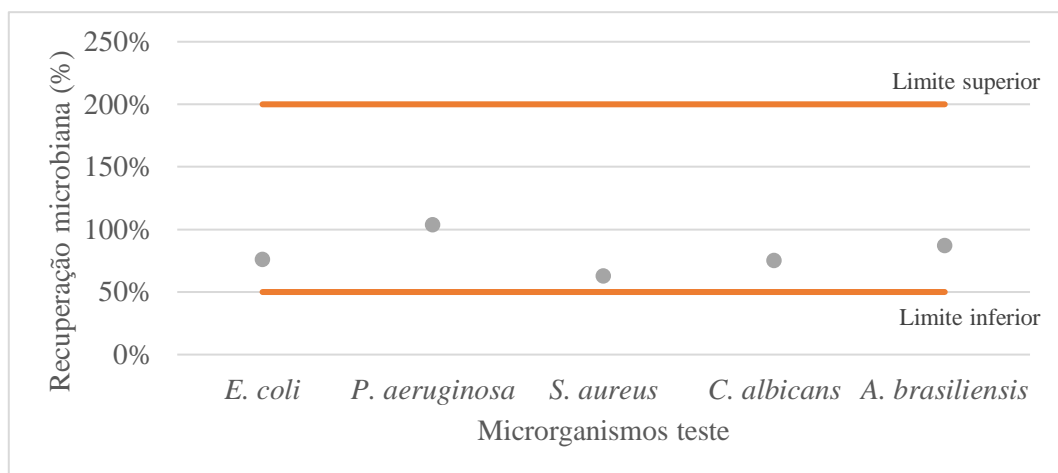


Figura 4.6- Resultado da recuperação microbiana no shampoo com 10% álcool testando a diluição 1:100 em eugon

Tabela 4.4- Resultados do Ensaio de Eficácia de Conservantes ao longo dos 28 dias para as duas formulações do shampoo com 10% e 20% de álcool

Produto	Microrganismo	Inóculo		Contagem dos microrganismos sobreviventes no produto						
				Dia 0 ¹	Dia 7		Dia 14		Dia 28	
		ufc/ml	Log ₁₀	ufc/ml	ufc/ml	Log ₁₀	ufc/ml	Log ₁₀	ufc/ml	Log ₁₀
Shampoo com 20% álcool	<i>E. coli</i>	9,8x10 ⁵	6,0	0	0	-	0	-	0	-
	<i>P. aeruginosa</i>	9,0x10 ⁵	6,0	0	0	-	0	-	0	-
	<i>S. aureus</i>	1,1x10 ⁶	6,0	0	0	-	0	-	0	-
	<i>C. albicans</i>	9,8x10 ⁵	6,0	0	0	-	0	-	0	-
	<i>A. brasiliensis</i>	4,3x10 ⁵	5,6	4,3x10 ⁵	-	-	0	-	0	-
Shampoo com 10% álcool	<i>E. coli</i>	9,8x10 ⁵	6,0	0	0	-	0	-	0	-
	<i>P. aeruginosa</i>	9,0x10 ⁵	6,0	0	0	-	0	-	0	-
	<i>S. aureus</i>	1,1x10 ⁶	6,0	0	0	-	0	-	0	-
	<i>C. albicans</i>	9,8x10 ⁵	6,0	3,0x10 ⁴	0	-	0	-	0	-
	<i>A. brasiliensis</i>	4,3x10 ⁵	5,6	4,7x10 ⁵	-	-	0	-	0	-

¹As contagens de colônias obtidas no 1º dia do ensaio (dia zero) são resultados meramente informativos

Os resultados das contagens microbianas nas amostras contaminadas comprovam que o álcool tem atividade antimicrobiana, mesmo numa concentração de metade da concentração inicial. Os fungos demoram mais tempo a serem completamente inativados pela ação do álcool, uma vez que a esporulação é um processo complexo [85].

As contagens microbianas obtidas foram posteriormente convertidas em log₁₀ e foi calculada a sua redução logarítmica, que se encontram na tabela 4.5.

Tabela 4.5- Resultados das reduções logarítmicas para as duas formulações do shampoo com 10% e 20% de álcool

Produto	Microrganismo	Redução log ₁₀			Resultado	
		7º dia	14º dia	28º dia	Resultado por microrganismo	Resultado final do EEC
Shampoo com 20% álcool	<i>E. coli</i>	6,0	6,0 e NA ¹	6,0 e NA	Eficaz	<u>Eficaz</u>
	<i>P. aeruginosa</i>	6,0	6,0 e NA	6,0 e NA	Eficaz	
	<i>S. aureus</i>	6,0	6,0 e NA	6,0 e NA	Eficaz	
	<i>C. albicans</i>	6,0	6,0 e NA	6,0 e NA	Eficaz	
	<i>A. brasiliensis</i>	-	5,6	5,6 e NA	Eficaz	
Shampoo com 10% álcool	<i>E. coli</i>	6,0	6,0 e NA	6,0 e NA	Eficaz	<u>Eficaz</u>
	<i>P. aeruginosa</i>	6,0	6,0 e NA	6,0 e NA	Eficaz	
	<i>S. aureus</i>	6,0	6,0 e NA	6,0 e NA	Eficaz	
	<i>C. albicans</i>	6,0	6,0 e NA	6,0 e NA	Eficaz	
	<i>A. brasiliensis</i>	-	5,6	5,6 e NA	Eficaz	

¹ NA- nenhum aumento quando comparado com o tempo anterior

Uma vez que estes produtos são considerados cosméticos, foram seguidos os critérios estabelecidos pela norma ISO 11930:

- Para as bactérias: uma redução logarítmica igual ou superior a 3 da contagem inicial no 7º dia do ensaio e nos 14º dia e 28º dia, uma redução igual ou superior a 3 log₁₀ e nenhum aumento comparado com o tempo anterior.
- Para a *C. albicans*: uma redução igual ou superior a 1 log₁₀ da contagem inicial no 7º dia e nos 14º dia e 28º dia, uma redução superior a 1 log₁₀ da contagem inicial e nenhum aumento comparado com o tempo anterior.
- Para fungos, deve haver uma redução logarítmica igual ou superior a 0 da contagem inicial no 14º dia e no 28º dia, uma redução logarítmica igual ou superior a 1 da contagem inicial e nenhum aumento comparado com o 14º dia.

Comparando os resultados das reduções logarítmicas obtidas (tabela 4.5) com estes critérios de aceitação, observa-se que as duas formulações em análise são eficazes a nível microbiano. Verifica-se que apesar de se reduzir a quantidade de álcool para 10% na formulação, o produto continua a ser eficaz contra os microrganismos em estudo. Desta forma é garantido que mesmo ocorrendo a evaporação de metade do teor de álcool na formulação, o produto continua a ter ação antimicrobiana.

4.4. Análise da eficácia antimicrobiana do suplemento vitamínico

O suplemento alimentar testado é composto, essencialmente, por água e outros nutrientes e substâncias com valores nutricionais. Devido à presença de água na sua formulação, foram incorporados sorbato de potássio e benzoato de sódio como conservantes antimicrobianos capazes de proteger o produto. Este produto apresenta um pH de 5,5, que se encontra dentro da gama de pH em que os microrganismos são capazes de proliferar. O suplemento vitamínico foi submetido ao EEC para analisar a sua eficácia antimicrobiana.

No método de validação foi testado utilizando a diluição 1:10 em água peptonada. A farmacopeia europeia recomenda a diluição como método de neutralização quando o produto tem na sua composição conservantes como os sorbatos. O resultado da validação deste método de neutralização encontra-se na figura 4.7.

Verifica-se que houve uma taxa de recuperação dentro do intervalo de 50% a 200% para todos os microrganismos, por isso a diluição 1:10 em APT ficou validada. Não houve necessidade de utilizar agentes neutralizantes específicos, uma vez que a própria matriz líquida do produto facilita a sua solubilização. As respetivas contagens microbianas obtidas estão no anexo A (tabela A7).

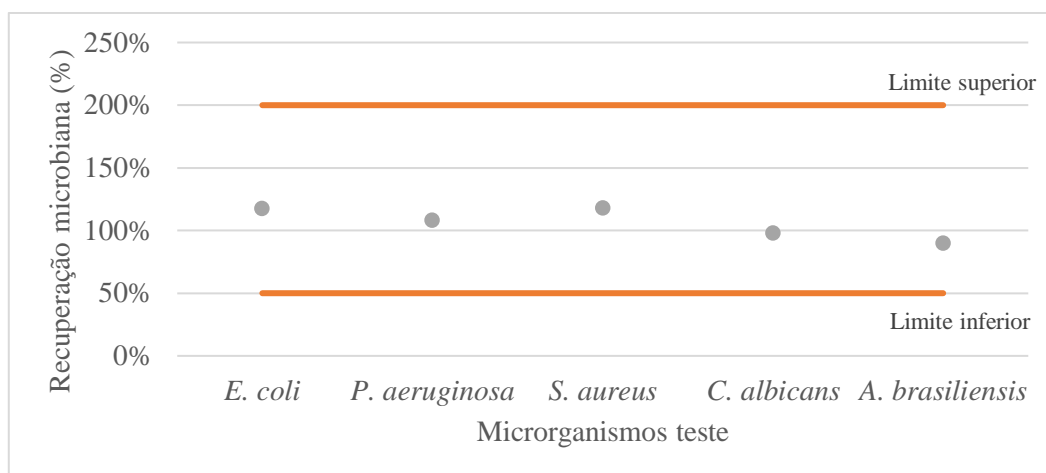


Figura 4.7- Resultado da recuperação microbiana no suplemento vitamínico testando a diluição 1:10 em APT

Os resultados das contagens microbianas obtidas nos tempos (0 horas, 14 e 28 dias) do ensaio de eficácia antimicrobiana encontram-se na tabela 4.6. Obteve-se as reduções logarítmicas das contagens microbianas apresentadas na tabela 4.7.

Atendendo aos critérios definidos pela farmacopeia europeia para preparações orais, verifica-se que este suplemento alimentar é eficaz contra estes microrganismos.

Tabela 4.6- Resultados do Ensaio de Eficácia de Conservantes ao longo dos 28 dias para o suplemento vitamínico

Produto	Microrganismo	Inóculo		Contagem dos microrganismos sobreviventes no produto				
				Dia 0	Dia 14		Dia 28	
		ufc/ml	Log ₁₀	ufc/ml	ufc/ml	Log ₁₀	ufc/ml	Log ₁₀
Suplemento vitamínico	<i>E. coli</i>	8,4x10 ⁵	5,9	8,6 x10 ⁵	0	-	0	-
	<i>P. aeruginosa</i>	5,3 x10 ⁵	5,7	5,5 x10 ⁵	0	-	0	-
	<i>S. aureus</i>	6,9 x10 ⁵	5,8	7,9 x10 ⁵	0	-	0	-
	<i>C. albicans</i>	9,4 x10 ⁵	6,0	8,3 x10 ⁵	0	-	0	-
	<i>A. brasiliensis</i>	3,2 x10 ⁵	5,5	2,9 x10 ⁵	0	-	0	-

Tabela 4.7- Resultados das reduções logarítmicas para o suplemento vitamínico

Produto	Microrganismo	Redução log ₁₀		Resultado	
		Da contagem inicial até ao 14º dia	Do tempo anterior até ao 28º dia	Resultado por microrganismo	Resultado final do EEC
Suplemento vitamínico	<i>E. coli</i>	5,9	NA	Eficaz	Eficaz
	<i>P. aeruginosa</i>	5,7	NA	Eficaz	
	<i>S. aureus</i>	5,8	NA	Eficaz	
	<i>C. albicans</i>	6,0	NA	Eficaz	
	<i>A. brasiliensis</i>	5,5	NA	Eficaz	

4.5. Análise da eficácia antimicrobiana da solução oral de paracetamol

O produto foi submetido a um teste de validação utilizando a diluição 1:10 em Eugon previamente do EEC. Dado que este produto tem como conservantes, dois parabenos, e a farmacopeia europeia recomenda a utilização de agentes emulsionantes como o *tween*® ou lecitina como método de neutralização. Uma vez que o Eugon tem na sua composição estes agentes tensioativos, foi testado este fluido neutralizante. O resultado desta validação encontra-se na figura 4.8.

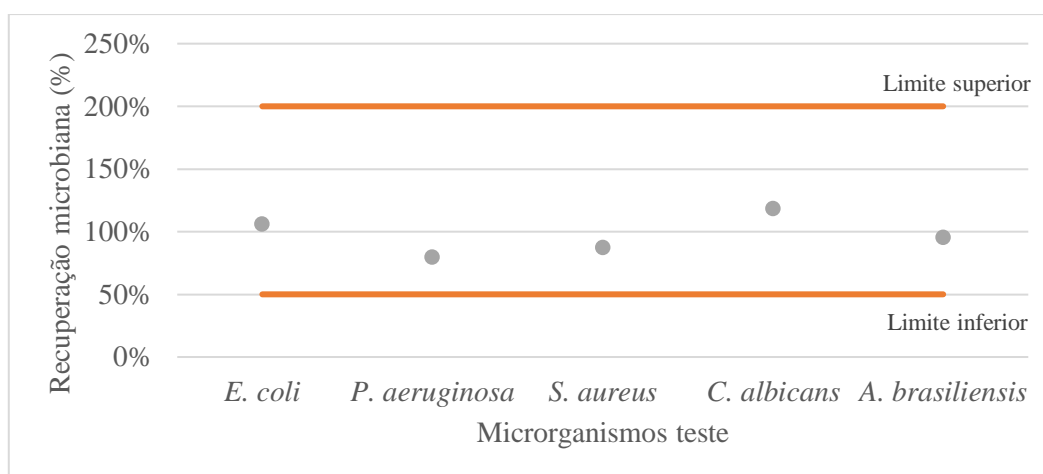


Figura 4.8- Resultado da recuperação microbiana na solução oral de paracetamol testando a diluição 1:10 em Eugon

Observa-se uma taxa de recuperação, para todos os microrganismos, dentro dos limites estabelecidos pelo que o método ficou validado. Por isso o EEC foi realizado utilizando este método de neutralização. Os resultados do ensaio encontram-se na tabela 4.8.

Tabela 4.8- Resultados do Ensaio de Eficácia de Conservantes ao longo dos 28 dias para a solução oral de paracetamol

		Inóculo		Contagem dos microrganismos sobreviventes no produto				
				Dia 0	Dia 14		Dia 28	
Produto	Microrganismo	ufc/ml	Log ₁₀	ufc/ml	ufc/ml	Log ₁₀	ufc/ml	Log ₁₀
Paracetamol solução oral	<i>E. coli</i>	6,1x10 ⁵	5,8	5,7 x10 ⁵	0	-	0	-
	<i>P. aeruginosa</i>	6,2 x10 ⁵	5,8	2,8 x10 ⁵	0	-	0	-
	<i>S. aureus</i>	6,9 x10 ⁵	5,8	7,4 x10 ⁵	0	-	0	-
	<i>C. albicans</i>	8,5 x10 ⁵	5,9	6,9 x10 ⁵	0	-	0	-
	<i>A. brasiliensis</i>	5,4 x10 ⁵	5,7	5,4 x10 ⁵	2,2x10 ²	2,3	1,7x10 ²	2,2

Da mesma forma que foi feito para os produtos anteriores, os resultados das contagens microbianas obtidas foram posteriormente convertidos em log₁₀ e calculou-se a sua redução logarítmica (ver tabela 4.9).

Tabela 4.9- Resultados das reduções logarítmicas para a solução oral de paracetamol

Produto	Microrganismo	Redução log ₁₀		Resultado	
		Da contagem inicial até ao 14º dia	Do tempo anterior até ao 28º dia	Resultado por microrganismo	Resultado final do EEC
Solução oral de Paracetamol	<i>E. coli</i>	5,8	NA	Eficaz	<u>Eficaz</u>
	<i>P. aeruginosa</i>	5,8	NA	Eficaz	
	<i>S. aureus</i>	5,8	NA	Eficaz	
	<i>C. albicans</i>	5,9	NA	Eficaz	
	<i>A. brasiliensis</i>	3,4	0,1	Eficaz	

Pela análise da tabela 4.9 e comparando com os critérios definidos pela farmacopeia europeia para preparações orais, verifica-se que a solução oral se mostrou eficaz a nível microbiano.

4.6. Análise da eficácia antimicrobiana do creme muda fraldas

O creme muda fraldas é um produto relativamente espesso e difícil de se homogeneizar. Por isso, na preparação das amostras do produto foram testadas diferentes formas para homogeneizar o produto, de modo a garantir a distribuição uniforme da amostra e da suspensão microbiana (ver tabela 4.10).

Após garantir a homogeneização do produto, realizou-se o ensaio de validação das diluições 1:10 e 1:100 em Eugon (4ª tentativa da tabela 4.10).

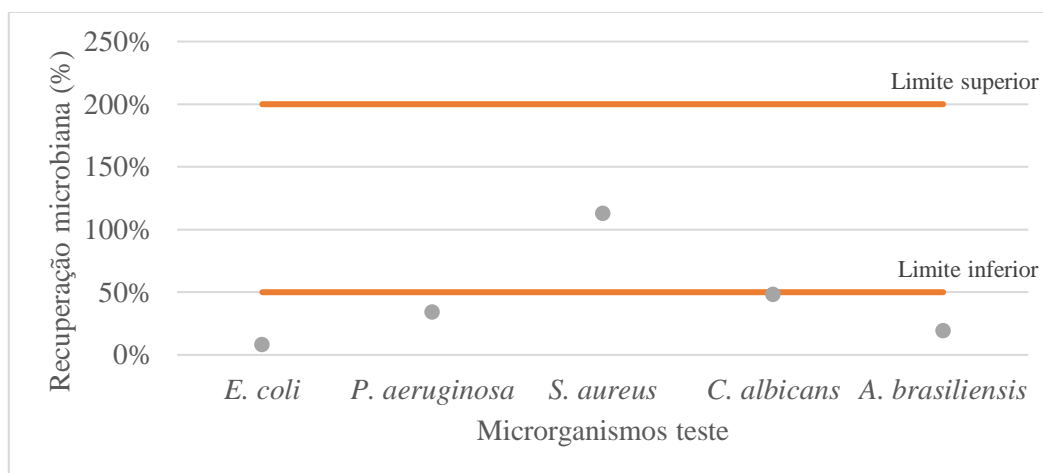
Os resultados das diluições 1:10 e 1:100 em Eugon estão representadas na figura 4.9. Observa-se que a diluição 1:100 em Eugon permite obter uma taxa de recuperação dentro dos limites aceitáveis, por isso foi o método de neutralização selecionado para o EEC.

Os resultados das contagens microbianas obtidas ao longo dos 28 dias estão representados na tabela 4.11. As respetivas reduções logarítmicas das contagens microbianas representadas na tabela anterior estão na tabela 4.12.

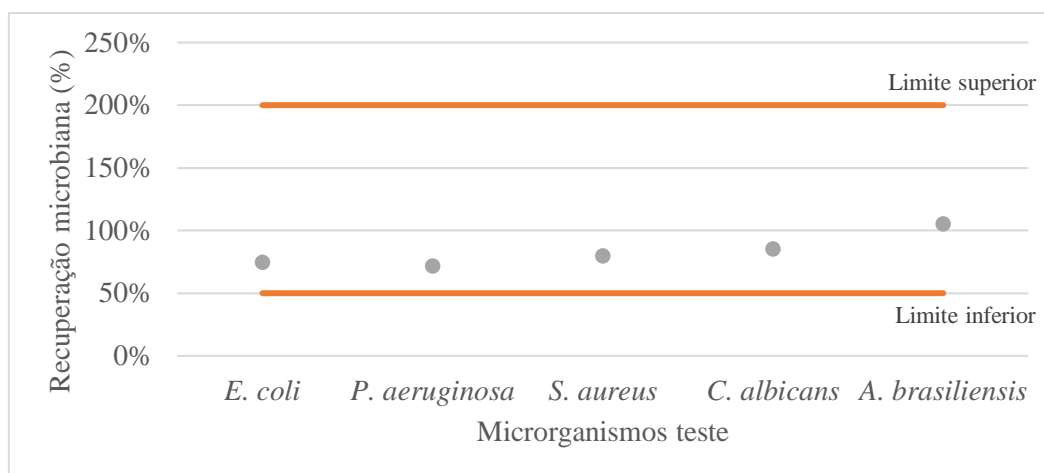
Tal como o shampoo para a queda do cabelo, o creme muda fraldas é considerado um produto cosmético, por isso foram seguidos novamente os critérios definidos pela norma ISO 11930. Analisando os resultados das reduções logarítmicas das contagens obtidas, verificou-se que o creme muda fraldas é um produto eficaz a nível microbiano.

Tabela 4.10- Formas para homogeneizar e dissolver o creme muda fraldas antes da validação do método de neutralização

Tentativas	Parte experimental: Preparação da amostra	Resultado da tentativa	Validação do método de neutralização
1ª tentativa	Manipulação da amostra: adição de 10% <i>tween</i> ® 80 Solvente: Eugon Diluição: 1:100	Continua espesso (difícil de garantir uma homogeneização eficiente)	-
2ª tentativa	Manipulação da amostra: aquecimento a 40-45°C durante 45 minutos Solvente: Eugon suplementado com 5% <i>tween</i> ® 80 Diluição: 1:100	Continua espesso (difícil de garantir uma homogeneização eficiente)	-
3ª tentativa	Manipulação da amostra: adição de 5% <i>tween</i> ® 80 e aquecimento a 40-45°C durante 45 minutos Solvente: Eugon Diluição: 1:100	Continua espesso (difícil de garantir uma homogeneização eficiente)	-
4ª tentativa	Manipulação da amostra: adição de 1% de <i>tween</i> ® 80 Solvente: Eugon suplementado com 5% <i>tween</i> ® 80 Diluições: 1:10 e 1:100	Melhor tentativa	As diluições 1:10 e 1:100 foram testadas



(a)



(b)

Figura 4.9- Resultado da recuperação microbiana no creme muda fraldas testando: (a) diluição 1:10 em Eugon; (b) diluição 1:100 em Eugon

4.7. Análise da eficácia antimicrobiana da pomada de Óxido de Zinco

Pretendeu-se analisar a eficácia antimicrobiana da pomada de óxido de Zinco. Esta pomada é um produto muito espesso e por isso também foi necessário testar diferentes formas para homogeneizar o produto antes de proceder à inoculação dos microrganismos.

A farmacopeia europeia recomenda a adição do miristato de isopropilo nas amostras do produto e/ou o aquecimento das amostras a uma temperatura de 40-45°C até ser possível manusear as mesmas, e posteriormente, garantir a homogeneização uniforme entre as amostras e as suspensões microbianas.

Para diluir as pequenas alíquotas do produto, foi testado o meio Eugon e um novo fluido neutralizante, o DEB. Como já foi referido, estes meios têm ambos, substâncias neutralizantes, no entanto, o DEB possui uma maior quantidade de lecitina e outras substâncias neutralizantes que o Eugon não tem na sua composição. Na tabela 4.13 estão representadas as diferentes formas testadas para homogeneizar o produto.

Verificou-se que a adição do miristato de isopropilo tornou as amostras menos espessas e que para efetuar as diluições, o meio Eugon permitiu uma melhor homogeneização. Por isso iniciou-se o ensaio da demonstração da eficácia da neutralização utilizando o miristato de isopropilo e a diluição 1:100 em meio Eugon. Os resultados da recuperação dos 5 microrganismos de ensaio estão representados na figura 4.10.

Testando a adição do miristato de isopropilo e a diluição 1:100 em Eugon obteve-se uma taxa de recuperação microbiana dentro do intervalo aceitável, pelo que foi este o método de neutralização selecionado para o EEC.

Tabela 4.11- Resultados do EEC ao longo dos 28 dias para o creme muda fraldas

Produto	Microrganismo	Inóculo		Contagem dos microrganismos sobreviventes no produto						
		ufc/ml	Log ₁₀	Dia 0	Dia 7		Dia 14		Dia 28	
				ufc/ml	ufc/ml	Log ₁₀	ufc/ml	Log ₁₀	ufc/ml	Log ₁₀
Creme muda fraldas	<i>E. coli</i>	8,6x10 ⁵	5,9	9,0 x10 ⁴	0	-	0	-	0	-
	<i>P. aeruginosa</i>	7,1 x10 ⁵	5,9	2,0 x10 ⁴	0	-	0	-	0	-
	<i>S. aureus</i>	7,5 x10 ⁵	5,9	3,0 x10 ⁴	0	-	0	-	0	-
	<i>C. albicans</i>	1,1 x10 ⁶	6,0	5,0 x10 ⁴	0	-	0	-	0	-
	<i>A. brasiliensis</i>	7,3 x10 ⁵	5,9	7,0 x10 ⁴	-	-	6,0 x10 ²	2,8	0	-

Tabela 4.12- Resultados das reduções logarítmicas para o creme muda fraldas

Produto	Microrganismo	Redução log ₁₀			Resultado por microrganismo	Resultado final do EEC
		7º dia	14º dia	28º dia		
Creme muda fraldas	<i>E. coli</i>	5,9	5,9 e NA	5,9 e NA	Eficaz	<u>Eficaz</u>
	<i>P. aeruginosa</i>	5,9	5,9 e NA	5,9 e NA	Eficaz	
	<i>S. aureus</i>	5,9	5,9 e NA	5,9 e NA	Eficaz	
	<i>C. albicans</i>	6,0	6,0 e NA	6,0 e NA	Eficaz	
	<i>A. brasiliensis</i>	-	3,1	5,9 e NA	Eficaz	

Tabela 4.13- Diferentes formas para facilitar a homogeneização da pomada de óxido de zinco

Tentativas	Parte experimental: preparação da amostra	Resultado da tentativa	Validação
1ª tentativa	Diluição: 1:100 Solvente: meio DEB	Amostra espessa (difícil de garantir uma homogeneização eficiente)	-
2ª tentativa	Manipulação da amostra: Adição de 200 µl de miristato de isopropilo Diluição: 1:100 Solvente: meio DEB	Amostra espessa (difícil de garantir uma homogeneização eficiente)	-
3ª tentativa	Manipulação da amostra: Adição de 200 µl de miristato de isopropilo Diluição: 1:100 Solvente: Eugon	Melhor tentativa	Resultado da recuperação microbiana representado na figura 4.14

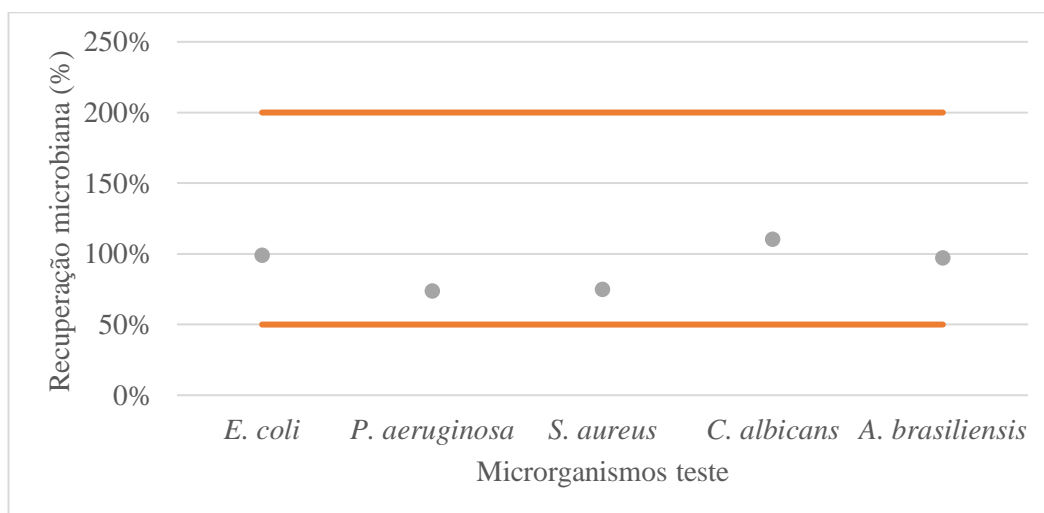


Figura 4.10- Resultado da recuperação microbiana na pomada de óxido de zinco testando a diluição 1:100 em Eugon com a adição do miristato de isopropilo

Os resultados das contagens microbianas obtidas no EEC estão na tabela 4.14 e as respectivas reduções logarítmicas encontram-se na tabela 4.15. Este produto é considerado um medicamento de aplicação tópica e por isso seguiu-se os critérios definidos pela farmacopeia europeia específicos para medicamentos tópicos.

Tabela 4.14-Resultados do EEC ao longo dos 28 dias para a pomada de óxido de zinco

Produto	Microrganismo	Inóculo		Contagem dos microrganismos sobreviventes no produto								
				Dia 0	Dia 2		Dia 7		Dia 14		Dia 28	
		ufc/ml	Log ₁₀	ufc/ml	ufc/ml	Log ₁₀	ufc/ml	Log ₁₀	ufc/ml	Log ₁₀	ufc/ml	Log ₁₀
Pomada de óxido zinco	<i>E.coli</i>	5,8x 10 ⁵	5,8	2,2x 10 ⁵	2,6 x10 ³	3,4	0	-	0	-	0	-
	<i>P. aeruginosa</i>	1,2x10 ⁶	6,1	1,7x 10 ⁵	0	-	0	-	0	-	0	-
	<i>S. aureus</i>	1,6x10 ⁶	6,2	3,9x10 ⁵	8,0 x10 ²	2,9	0	-	0	-	0	-
	<i>C. albicans</i>	1,7x10 ⁶	6,2	4,2 x10 ⁵	-	-	-	-	2,4x10 ⁴	4,4	1,5x10 ⁴	4,2
	<i>A. brasiliensis</i>	5,0x10 ⁵	5,7	1,1 x10 ⁵	-	-	-	-	2,9x10 ³	3,5	7,8x10 ³	3,9

Tabela 4.15- Resultados das reduções logarítmicas para a pomada de óxido de zinco

Produto	Microrganismo	2º dia	Redução log ₁₀				Resultado por microrganismo	Resultado final do EEC
			7º dia	14º dia	28º dia			
Pomada de óxido zinco	<i>E. coli</i>	2,3	5,8	5,8	NA		Eficaz	<u>Não eficaz</u>
	<i>P. aeruginosa</i>	6,1	6,1	6,1	NA		Eficaz	
	<i>S. aureus</i>	3,3	6,2	6,2	NA		Eficaz	
	<i>C. albicans</i>	-	-	1,8	0,2		Não eficaz	
	<i>A. brasiliensis</i>	-	-	2,2	-0,4		Não eficaz	

A pomada não cumpre com dois dos critérios de aceitação:

1. Para a *C. albicans*: Houve apenas uma redução logarítmica de 1,8 no 14º dia. A EP exige uma redução logarítmica de 2;
2. Para o *A. brasiliensis*: Houve aumento logarítmico de 0,4 no 28º dia em relação ao 14º dia. A EP refere que não pode haver nenhum aumento no 28º dia quando comparado com o 14º dia.

Por esta razão o EEC para este produto não foi considerado eficaz. Este resultado pode dever-se ao facto das 2 amostras inoculadas, uma com a *C. albicans* e outra com o *A. brasiliensis* não estarem eficientemente homogeneizadas.

4.8. Análise da variabilidade e reprodutibilidade do Ensaio de Eficácia de Conservantes

Pretendeu-se analisar todas as potenciais causas de variabilidade associadas ao Ensaio de Eficácia de Conservantes. Para isso esquematizou-se todas estas causas num diagrama de Causa-Efeito ou *Ishikawa*. Consideraram-se 6 categorias de causas gerais (conhecido pelo diagrama dos 6M) que se adequam ao problema em questão: variabilidade do método do EEC. As 6 categoriais são: Materiais, Meio ambiente, Máquina, Mão-de-obra, Método e Medida. O diagrama encontra-se representado na figura 4.11.

Para demonstrar que o EEC é um ensaio reprodutível, o mesmo produto foi submetido três vezes ao EEC, sendo que duas das vezes foram realizadas pelo próprio autor desta dissertação e uma terceira vez, por um analista de microbiologia. O produto analisado é uma solução oral para a tosse, que devido à própria formulação possuir propriedades antimicrobianas, não tem conservantes antimicrobianos na sua composição.

Os resultados das contagens dos microrganismos sobreviventes e as respetivas reduções logarítmicas para as 3 amostras do mesmo produto encontram-se representadas nas tabelas 4.16 e 4.17, respetivamente. As contagens obtidas não diferem muito entre si, pois a ordem de grandeza manteve-se a mesma. Em termos de redução logarítmica, obteve-se exatamente os mesmos resultados para as 3 amostras analisadas do mesmo lote do produto. Estes resultados permitem demonstrar a reprodutibilidade do EEC.

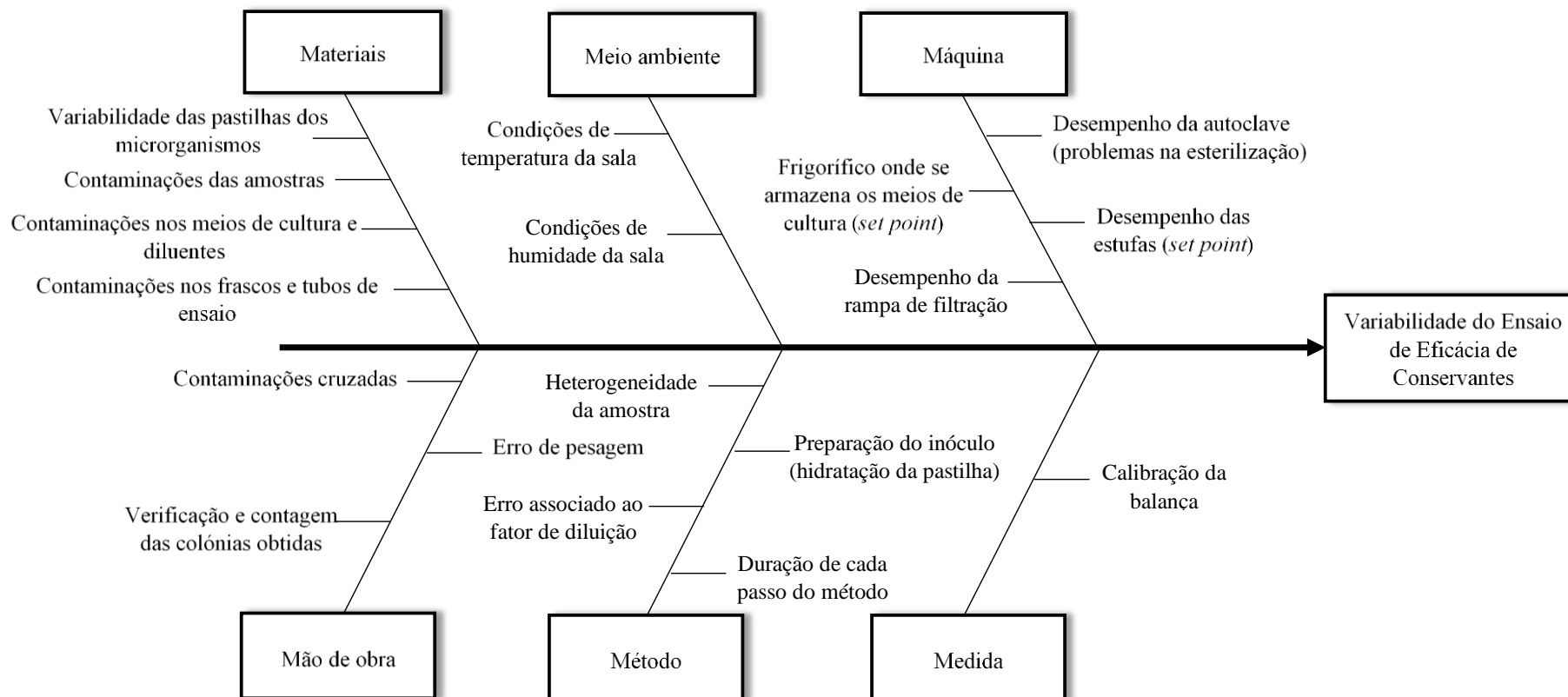


Figura 4.11- Diagrama Causa-Efeito referente ao Ensaio de Eficácia de Conservante

Tabela 4.16- Resultados do EEC ao longo dos 28 dias para o medicamento para a tosse (3 amostras)

			Inóculo		Contagem dos microrganismos sobreviventes no produto				
					Dia 0	Dia 14		Dia 28	
	Produto	Microrganismo	ufc/ml	Log ₁₀	ufc/ml	ufc/ml	Log ₁₀	ufc/ml	Log ₁₀
Operador 1 ¹	Medicamento para a tosse	<i>E. coli</i>	8,9x10 ⁵	5,9	4,1 x10 ⁵	0	-	0	-
		<i>P. aeruginosa</i>	6,8 x10 ⁵	5,8	5,3 x10 ⁵	0	-	0	-
		<i>S. aureus</i>	7,6 x10 ⁵	5,9	7,4 x10 ⁵	0	-	0	-
		<i>C. albicans</i>	1,0 x10 ⁶	6,0	7,2 x10 ⁵	0	-	0	-
		<i>A. brasiliensis</i>	6,1 x10 ⁵	5,8	5,8 x10 ⁵	3,6x10 ²	2,6	1,1x10 ²	2,0
Operador 1		<i>E. coli</i>	8,9 x10 ⁵	5,9	3,3 x10 ⁵	0	-	0	-
		<i>P. aeruginosa</i>	6,8 x10 ⁵	5,8	5,8 x10 ⁵	0	-	0	-
		<i>S. aureus</i>	7,6 x10 ⁵	5,9	9,0 x10 ⁵	0	-	0	-
		<i>C. albicans</i>	1,0 x10 ⁶	6,0	7,1 x10 ⁵	0	-	0	-
		<i>A. brasiliensis</i>	6,1 x10 ⁵	5,8	5,1 x10 ⁵	3,5x10 ²	2,5	1,0x10 ²	2,0
Operador 2 ²		<i>E. coli</i>	8,9 x10 ⁵	5,9	4,1 x10 ⁵	0	-	0	-
		<i>P. aeruginosa</i>	6,8 x10 ⁵	5,8	5,0 x10 ⁵	0	-	0	-
		<i>S. aureus</i>	7,6 x10 ⁵	5,9	1,0 x10 ⁶	0	-	0	-
		<i>C. albicans</i>	1,0 x10 ⁶	6,0	6,9 x10 ⁵	0	-	0	-
		<i>A. brasiliensis</i>	6,1 x10 ⁵	5,8	5,0 x10 ⁵	3,3x10 ²	2,5	1,3x10 ²	2,1

¹Operador 1- Ensaio realizado pelo próprio autor desta dissertação; ²Operador 2- Ensaio realizado por um analista de microbiologia

Tabela 4.17- Resultados das reduções logarítmicas para o medicamento para a tosse (3 amostras)

	Produto	Microrga- nismo	Da contagem inicial até ao 14º dia	Do tempo an- terior até ao 28ºdia	Resultado por microrganismo	Resultado final do EEC
Operador 1 ¹	medica- mento para a tosse	<i>E. coli</i>	5,9	NA	Eficaz	Eficaz
		<i>P. aeruginosa</i>	5,8	NA	Eficaz	
		<i>S. aureus</i>	5,9	NA	Eficaz	
		<i>C. albicans</i>	6,0	NA	Eficaz	
		<i>A. brasiliensis</i>	5,8	0,6	Eficaz	
Operador 1		<i>E. coli</i>	5,9	NA	Eficaz	Eficaz
		<i>P. aeruginosa</i>	5,8	NA	Eficaz	
		<i>S. aureus</i>	5,9	NA	Eficaz	
		<i>C. albicans</i>	6,0	NA	Eficaz	
		<i>A. brasiliensis</i>	5,8	0,5	Eficaz	
Operador 2 ²	<i>E. coli</i>	5,9	NA	Eficaz	Eficaz	
	<i>P. aeruginosa</i>	5,8	NA	Eficaz		
	<i>S. aureus</i>	5,9	NA	Eficaz		
	<i>C. albicans</i>	6,0	NA	Eficaz		
	<i>A. brasiliensis</i>	5,8	0,4	Eficaz		

¹Operador 1- Ensaio realizado pelo próprio autor desta dissertação; ²Operador 2- Ensaio realizado por um analista de microbiologia

5. Conclusões e propostas de trabalho futuro

Este trabalho teve como primeiro foco a compilação das principais diferentes das metodologias do Ensaio de Eficácia de Conservantes para medicamentos e cosméticos. Na parte experimental deste trabalho, os medicamentos foram analisados segundo o capítulo 5.1.3. da farmacopeia europeia e os produtos cosméticos segundo a norma ISO 11930.

Todos os produtos considerados medicamentos orais cumprem com os critérios de aceitação definidos pela farmacopeia europeia. O medicamento de aplicação tópica analisado, a pomada de óxido de zinco, não cumpre com dois dos critérios de aceitação da EP para os microrganismos *C. albicans* e *A. brasiliensis*. Pelo que este produto deve ser sujeito a uma confirmação, repetindo o EEC.

Os produtos cosméticos cumprem com os critérios de aceitação definidos pela norma ISO 11930. Por esta razão todos os produtos analisados foram considerados eficazes contra bactérias, levedura e fungo, à exceção da pomada de óxido de zinco, que não se demonstrou eficaz contra a levedura e o fungo.

Relativamente ao produto Ibuprofeno suspensão oral, com base nos EEC, foi possível determinar a concentração mínima eficaz de conservante necessária para o produto se manter estável e eficaz a nível microbiano. Atendendo aos resultados das reduções logarítmicas, conclui-se que a partir da concentração de 80% de conservante (benzoato de sódio), relativamente ao valor pretendido inicialmente, o produto demonstrou-se eficaz. Uma vez que o produto demonstrou possuir propriedades antimicrobianas sem a presença de conservantes, foi realizado um segundo estudo a este produto. A suspeita incidia sobre a possibilidade de a própria substância ativa ser capaz de inibir certos microrganismos, o que veio a confirmar-se com os testes efetuados.

O produto foi formulado com diferentes concentrações de ibuprofeno e todas as formulações preparadas foram submetidas ao EEC. Conclui-se que à medida que a concentração de ibuprofeno diminui, existe uma maior recuperação dos microrganismos inoculados. No entanto, tal fato só se verificou na levedura *C. albicans* e no fungo *A. brasiliensis*. Mesmo com a concentração de ibuprofeno mais baixa testada, não houve nenhuma recuperação das bactérias inoculadas, pelo que se conclui que este API tem uma forte ação antibacteriana. Seria interessante num trabalho futuro, testar outros conservantes com propriedades antifúngicas, uma vez que o ibuprofeno já tem ação sobre as bactérias.

Um dos produtos cosméticos analisados, o shampoo para a queda de cabelo, possui na sua composição, 20% de álcool que lhe confere uma eficácia antimicrobiana, como refere a ISO 29261 [10]. Tal fato foi comprovado, submetendo esta formulação ao EEC. Pretendeu-se ainda saber se o produto continua a ser eficaz se ocorresse a evaporação do álcool, por isso o mesmo produto foi formulado com metade da quantidade de álcool e submeteu-se ao EEC, simulando o pior cenário

possível. Os resultados obtidos concluíram que mesmo com metade do álcool na formulação, o produto é considerado eficaz.

Uma das maiores limitações do Ensaio de Eficácia de Conservantes é garantir a homogeneidade da amostra, principalmente em produtos mais espessos, como cremes e emulsões. Outro problema associado a este tipo de produtos, é o erro de pesagem, uma vez que há uma maior probabilidade de pequenas porções das amostras ficarem retidas nas ansas estéreis utilizadas, não garantindo que as quantidades medidas foram exatas.

Com o intuito de resolver estas limitações, foram testadas diferentes formas para homogeneizar e baixar a viscosidade do creme muda fraldas e da pomada de óxido de zinco. Para o creme muda fraldas, obteve-se uma melhor homogeneização adicionando 1% de *tween*® 80 no produto. As pequenas alíquotas do produto retiradas nos dias do ensaio foram diluídas num meio Eugon enriquecido com mais 5% de *tween*® 80. Para a pomada de óxido de zinco, uma vez que se trata de um produto muito espesso, foi adicionado 10% de miristato de isopropilo ao produto. Este agente emulsionante permitiu manusear melhor o produto, verificando-se uma boa homogeneização. Para diluir as alíquotas desta emulsão nos dias do ensaio, recorreu-se a dois meios neutralizantes diferentes, o Eugon e o DEB. No entanto, só o Eugon permitiu a homogeneização das amostras.

Tentou-se demonstrar a reprodutibilidade do EEC testando o mesmo produto três vezes. Apesar de os resultados obtidos terem sido idênticos, num trabalho futuro, mais amostras do mesmo produto devem ser testadas.

Referências bibliográficas

- [1] “5.1.3. Efficacy of antimicrobial preservation,” em *European Pharmacopoeia, edition 9.3*, 2018, p. 557.
- [2] E. Liikanen, “DIRECTIVA 2003/94/CE DA COMISSÃO de 8 de Outubro de 2003 que estabelece princípios e directrizes das boas práticas de fabrico de medicamentos para uso”, em *Jornal Oficial da União Europeia*, 2003.
- [3] "Chapter 51: Antimicrobial Effectiveness Testing" em *United States Pharmacopoeia*, 40ª edition, 2018.
- [4] “LIST OF PRESERVATIVES ALLOWED IN COSMETIC PRODUCTS,” em *European Commission: Annex V*, em *CosIng*, 2018.
- [5] C. Booth, “Antimicrobial Effectiveness Testing Validation Strategies,” 29 Agosto 2014. [Online]. Available: <http://www.ivtnetwork.com/article/antimicrobial-effectiveness-testing-validation-strategies>. [Acedido em 20 Março 2018].
- [6] “Minimum Inhibitory Concentration (MIC),” Pacific BioLabs, 2017. [Online]. Available: http://www.pacificbiolabs.com/testing_mic.asp. [Acedido em 20 Março 2018].
- [7] D. S. Orth, J. J. Kabara, S. P. Denger e S. K. Tan, “Concentration of Preservatives,” em *Cosmetic and Drug Microbiology*, New York, Taylor & Francis Group, 2006, p. 75.
- [8] C. L. Moser e B. K. Meyer, “Comparison of Compendial Antimicrobial Effectiveness Tests: A Review,” *AAPS PharmaSciTech*, vol. 12, nº1, 2011.
- [9] S. P. D. a. R. M. Baird, “Preservative Stability and Efficacy: Formulation Influences,” em *Guide to Microbiological Control in Pharmaceuticals and Medical Devices*, 2º edition, New York, London, Taylor & Francis Group, 2007, pp. 352-361.
- [10] “Cosmetics- Microbiology- Guidelines for the risk assessment and identification of microbiologically low-risk products,” em *ISO 29621*, Switzerland, 2010.
- [11] P. D. Scott Sutton, “The Antimicrobial Efficacy Test, GMP and Investigations,” *Review*, vol. 16, nº5, 2013.

- [12] Personal Care Council, "Determination of Preservation Efficacy in Water- Miscible Personal Care Products," 2013.
- [13] "Preservatives for Cosmetic," 2016. [Online]. Available: http://www.ingredientstodiefor.com/item/Preservatives_for_Cosmetics/281/. [Acedido em 20 Abril 2018].
- [14] U. T. Shrestha, "Factors affecting microbial spoilage of pharmaceutical products," 11 setembro 2017. [Online]. Available: <http://upendrats.blogspot.com/2017/09/factors-affecting-microbial-spoilage-of.html>. [Acedido em 7 junho 2018].
- [15] P. Takeo Mitsui, "Preservation of cosmetics," em *New Cosmetic Science*, Amsterdam, Elsevier, 1ª edition, 1998, p. 199.
- [16] D. J. English, "Microbiology in Cosmetics – Challenges in Cosmetic Manufacturing," [Online]. Available: http://www.cbinet.com/sites/default/files/files/English_Don_pres.pdf. [Acedido em 4 Maio 2018].
- [17] L. Clontz, "Microbial Contamination and Control," em *Microbial Limit and Bioburden Tests*, 2ª edition, New York, London, Taylor & Francis Group, 2009, p. 35.
- [18] "Microbial contamination, spoilage and preservation of medicines," 8 Fevereiro 2015. [Online]. Available: <https://clinicalgate.com/microbial-contamination-spoilage-and-preservation-of-medicines/>. [Acedido em 25 Março 2018].
- [19] D. S. Orth, J. J. Kabara, S. P. Denyer e S. K.Tan, "Contamination and spoilage," em *Cosmetic and Drug Microbiology*, New York, London, CRC Press Taylor & Francis Group , 2006, p. 27.
- [20] D. S. Orth, J. J. Kabara, S. P. Denyer e S. K.Tan, "Preservation of cosmetics and drugs," em *Cosmetic and Drug Microbiology*, New York, London, CRC Press Taylor & Francis Group, 2006, p. 2.
- [21] S. P. Denyer e R. M. Baird, "Preservative Stability and Efficacy: Formulation Influences," em *Guide to Microbiological Control in Pharmaceuticals and Medical Devices*, 2ª edition, New York, London, Taylor & Francis Group, 2007, pp. 350-351.
- [22] D. P. Elder e P. J. Crowley, "Antimicrobial Preservatives Part One: Choosing a Preservative System," 15 Agosto 2017. [Online]. Available: <https://www.americanpharmaceuticalreview.com/Featured-Articles/341194-Antimicrobial-Preservatives-Part-One-Choosing-a-Preservative-System/>. [Acedido em 28 Março 2018].

- [23] J. Kaur, "Preservatives Used in Pharmaceutical Industry," 14 Junho 2017. [Online]. Available: <http://pharmapathway.com/preservatives-used-in-pharmaceutical-industry/>. [Acedido em 2 Maio 2018].
- [24] R. C. Rowe, P. J. Sheskey e M. E. Quinn, "Chlorhexidine," em *Handbook of Pharmaceutical Excipients*, 6^a edition, New York, APha, 2009, p. 162.
- [25] J. P. R. Loyd V. Allen, "Preservatives, Antioxidants and pH," 30 Maio 2017. [Online]. Available: <https://www.perrigo.com/business/pdfs/Sec%20Artem%2018.1.pdf>. [Acedido em 2 Maio 2018].
- [26] G. S. Banker, M. M. Rieger e H. A. Lieberman, em *Pharmaceutical Dosage Forms: Disperse Systems volume 2*, New York, Dekker, 1989.
- [27] D. S. Orth, J. J. Kabar, S. P. Denyer e S. K. Tan, "PRESERVATIVE COMBINATIONS AND ENHANCERS," em *Cosmetic and Drug Microbiology*, New York, London, Taylor & Francis Group, 2006, p. 35.
- [28] S. P. D. r, W. B. Hugo e V. D. Harding, "Synergy in preservative combinations," *International Journal of Pharmaceutics- Elsevier*, 1985.
- [29] R. C. Rowe, P. J. Sheskey e M. E. Quinn, "Methylparaben," em *Handbook of Pharmaceutical Excipients*, 6^a edition, Pharmaceutical Press, 2009, p. 442.
- [30] S. M. Shaikh, R. C. Doijad, A. S. Shete1 e P. S. Sankpa, "A review on: Preservatives used in pharmaceuticals and impacts on health," 1 Maio 2016. [Online]. Available: <https://www.pharmatutor.org/articles/a-review-on-preservatives-used-in-pharmaceuticals-and-impacts-on-health>. [Acedido em 22 Março 2018].
- [31] R. C. Rowe e M. E. Q. Paul J Sheskey, "Edetic Acid," em *Handbook of Pharmaceutical Excipients*, 6^a edition, London, Pharmaceutical Press, 2009, p. 247.
- [32] S. P. Denyer e R. M. Baird, "Chelating Agents," em *Guide to Microbiological Control in Pharmaceuticals and Medical Devices*, 2^a edition, New York, London, CRC Press- Taylor & Francis Group, 2007, p. 360.
- [33] F. R. Lourenço, "Teste de eficácia de conservantes de medicamentos e cosméticos," Outubro 2016. [Online]. Available: https://edisciplinas.usp.br/pluginfile.php/2211766/mod_resource/content/1/Efic%C3%A1cia%20de%20Conservantes.pdf. [Acedido em 2 Abril 2018].

- [34] D. Winn, "Preservatives for cosmetic, toiletry and pharmaceutical compositions". Patente EP2224973A1, 29 Novembro 2007.
- [35] M. Braun, "MIC Determination," [Online]. Available: <https://www.labor-ls.de/en/services/microbiological-testing-sterile-products/mic-determination.html>. [Acedido em 2 Maio 2018].
- [36] P. Philip A. Geis, "Chlorhexidine digluconate," em *Cosmetic Microbiology*, 2ª edition, New York, London, Taylor & Francis Group, 2006, p. 240.
- [37] R. M. Baird, N. A. Hodges e S. P. Denyer, "Table 10.1 Examples of preservatives commonly used in pharmaceutical formulations," em *Handbook of Microbiological Quality Control*, 1ª edition, New York, Taylor & Francis, 2005, p. 189.
- [38] Eastman, "Sorbic Acid and Potassium Sorbate as Cosmetic Preservatives," Abril 1998. [Online]. Available: http://www.lotioncrafter.com/pdf/Sorbic_Acid_and_Potassium_Sorbate.pdf. [Acedido em 4 Maio 2018].
- [39] R. C. Rowe, P. J. Sheskey e M. E. Quinn, "Sodium Benzoate," em *Handbook of Pharmaceutical Excipients*, 6ª edition, APha, 2009, p. 627.
- [40] L. Clontz, "TABLE 2.5 Preservative Systems used in Pharmaceutical Formulations," em *Microbial Limit and Bioburden Tests*, 2ª edition, CRC Press, 2009, p. 45.
- [41] R. C. Rowe, P. J. Sheskey e M. E. Quinn, "Potassium Benzoate," em *Handbook of Pharmaceutical Excipients*, 6ª edition, APha, 2009, p. 569.
- [42] R. C. Rowe, P. J. Sheskey e M. E. Quinn, "Benzoic Acid," em *Handbook of Pharmaceutical Excipients*, 6ª edition, APha, 2009, p. 61.
- [43] EMEA, "ICH Topic Q 6 A Specifications: Test Procedures and Acceptance Criteria for New Drug Substances and New Drug Products: Chemical Substances," Maio 200.
- [44] R. Baker, "Cosmetic Challenge Testing: Why Even Well-Known Preservatives Need Testing," 2017. [Online]. Available: <http://chemistscorner.com/cosmetic-challenge-testing-why-even-well-known-preservatives-need-testing/>. [Acedido em 11 Abril 2018].
- [45] M. Goins, "Determining antimicrobial effectiveness," 9 Março 2018. [Online]. Available: <https://www.qlaboratories.com/determining-antimicrobial-effectiveness/>. [Acedido em 28 Março 2018].

- [46] “Preservative Efficacy Tests,” 2018. [Online]. Available: <https://www.copybook.com/companies/rssl/articles/preservative-efficacy-tests>. [Acedido em 11 Abril 2018].
- [47] “Preservatives- Effectiveness Tests,” em *Japanese Pharmacopoeia, edition XIV*, p. 1321.
- [48] S. Arora, “Preservative Efficacy Test,” 1 Fevereiro 2013. [Online]. Available: <http://lab-training.com/2013/02/01/preservative-efficacy-test/>. [Acedido em 22 Março 2018].
- [49] L. Jimenez, “Antimicrobial Effectiveness and Preservatives,” em *Microbial Contamination Control in the Pharmaceutical Industry*, Pinehurst, North Carolina, 2004, p. 287.
- [50] R. Jakober, “Preservative Challenge Testing of Lotions and Creams,” 28 Janeiro 2013. [Online]. Available: <http://blog.microbiologynetwork.com/261/preservative-challenge-testing-of-lotions-and-creams/>. [Acedido em 11 Junho 2018].
- [51] “2.6.12. Microbial Examination Of Non-Sterile Products: Microbial Enumeration Tests,” em *European Pharmacopoeia, edition 9.0*, 2018, p. 195.
- [52] “2.6.12. Microbiological Examination of Non-Sterile Products: Microbial Enumeration Tests,” em *European Pharmacopoeia, edition 9.0*, 2018, p. 196.
- [53] “<61> Microbiological examination of nonsterile products: Microbial enumeration tests,” em *United States Pharmacopeia*, 2018.
- [54] “Personal Care Products Council,” 2018. [Online]. Available: <https://www.personalcarecouncil.org/about-us/history?page=4>. [Acedido em 2 Abril 2018].
- [55] “Cosmetics- Microbiology- Evaluation of the antimicrobial protection of a cosmetic product,” em *International Standard- ISO 11930*, 2012.
- [56] D. S. Orth, J. J. Kabara, S. P. Denyer e S. K.Tan, “Challenge Test Microorganisms,” em *Cosmetic and Drug Microbiology*, CRC Press, 2006, p. 92.
- [57] D. S. Orth, J. J. Kabara, S. P. Denyer e S. K.Tan, “CTFA Method,” em *Cosmetic and Drug Microbiology*, New York London, CRC Press Taylor & Francis Group, 2006, p. 114.
- [58] P. Philip A. Geis, “CTFA method,” em *Cosmetic Microbiology*, 1ª edition, Taylor & Francis, 2006, p. 118.

- [59] BioScreen, “BioScreen Preservative Effectiveness Testing,” 2016. [Online]. Available: <http://www.bioscreen.com/preservative-testing>. [Acedido em 4 Maio 2018].
- [60] W. Siegert, “ISO 11930 – A Comparison to other Methods to Evaluate the Efficacy of Antimicrobial Preservation,” *SOFW-Journal*, 2012.
- [61] P. Scott Sutton, “Preservation Efficacy Testing,” 2011. [Online]. Available: <http://www.microbiol.org>. [Acedido em 5 Maio 2018]
- [62] P. Philip A. Geis, “D-value methods,” em *Cosmetic Microbiology: A Practical Approach*, 1ª edition, New York, London, Taylor & Francis Group, 2006, p. 124.
- [63] R. M. Baird, N. A. Hodges e S. P. Denyer, “10.2.1 Selection of viable counting method and demonstration of operator competence,” em *Handbook of Microbiological Quality Control*, 1ª edition, New York, Taylor & Francis, 2005, p. 194.
- [64] L. Clontz, “TAMC and TYMC Tests via Membrane Filtration Method,” em *Microbial Limit and Bioburden Tests*, 2ª edition, New York, CRC Press, 2009, p. 73.
- [65] H. Wijerathne, “Enumeration techniques of bacteria in microbiology,” 13 Fevereiro 2017. [Online]. Available: <http://www.mynatureacademy.com/2017/02/enumeration-techniques-of-bacteria.html>. [Acedido em 4 Maio 2018].
- [66] N. Rijal, “Spread Plate Technique: Principle, Procedure and Result,” 28 Julho 2017. [Online]. Available: <https://microbeonline.com/spread-plate-technique-principle-procedure-results/>. [Acedido em 4 Maio 2018].
- [67] BioScreen, “Frequently Asked Questions,” Fevereiro 2006. [Online]. Available: http://bioscreen.com/images/technicalbulletins/TB02_Frequently_Asked_Questions.pdf. [Acedido em 5 Abril 2018].
- [68] P. Scott Sutton, “The Antimicrobial Effectiveness Test,” Março 2010. [Online]. Available: <http://www.microbiologynetwork.com/antimicrobial-efficacy-test.asp>. [Acedido em 22 Março 2018].
- [69] “*Microbiological Examination of Non-Sterile Products: Microbial Enumeration Tests*, em *European Pharmacopoeia*, edition 9.0, 2018, p. 197.

- [70] H. Mehrgan, F. Elmi, M. Fazeli, A. Shahverdi e N. Samadi, "Evaluation of Neutralizing Efficacy and Possible Microbial Cell Toxicity of a Universal Neutralizer Proposed by the CTPA," *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, vol. 5, 2006.
- [71] R. M. Baird, N. A. Hodges e S. P. Denyer, "2.2.1 Specialized media for neutralizing antimicrobial agents," em *Handbook of microbiological quality control*, 1ª edition, New York, Taylor & Francis, 2005, p. 24.
- [72] "Validation of microbial recovery from pharmacopeial articles," [Online]. Available: http://www.pharmacopeia.cn/v29240/usp29nf24s0_c1227.html. [Acedido em 13 Junho 2018].
- [73] CE.way, "Which cosmetic products don't require challenge test?," 2017. [Online]. Available: <http://www.ceway.eu/cosmetic-challenge-test/>. [Acedido em 13 Abril 2018].
- [74] EUR-Lex, "Commission Implementing Decision of 25 November 2013 on Guidelines on Annex I to Regulation (EC) No 1223/2009 of the European Parliament and of the Council on cosmetic products," *Official Journal of the European Union*, 2013.
- [75] N. A. Hodges, "Microbial contamination, spoilage and preservation of medicines," 8 Fevereiro 2015. [Online]. Available: <https://clinicalgate.com/microbial-contamination-spoilage-and-preservation-of-medicines/>. [Acedido em 23 Abril 018].
- [76] "Application of Water Activity Determination to Nonsterile Pharmaceutical Products," em *The United States Pharmacopeial Convention*, 2017, p. 1417.
- [77] D. Steinberg, "Effective vs. Ineffective Preservation Using Water Activity*," 5 janeiro 2011. [Online]. Available: <https://www.cosmeticsandtoiletries.com/formulating/function/preservatives/112901129.html>. [Acedido em 20 julho 2018].
- [78] S. P. Denyer e R. M. Baird, "Preservative Stability and Efficacy," em *Guide to Microbiological Control in Pharmaceuticals and Medical Devices*, 1ª edition, New York, CRC Press Taylor & Francis Group, 2007, p. 361.
- [79] D. Brannan, "Chelating Agents," em *Cosmetic Microbiology: A Practical Handbook*, 1ª edition, New York, CRC Press, 1997, p. 172.
- [80] S. P. Denyer e R. M. Baird, "Antibiotics," em *Guide to Microbiological Control in Pharmaceuticals and Medical Devices*, 1ª edition, New York, CRC Press Taylor & Francis Group, 2007, p. 360.

- [81] L. Clontz, “Nonsterile Products,” em *Microbial Limit and Bioburden Tests*, 2^a edition, New York, CRC Press Taylor & Francis Group, 2009, p. 38.
- [82] Y. Bouwman-Boer, V. Fenton-May e P. L. Brun, “19.2.2.5 Substances with Antimicrobial Properties,” em *Practical Pharmaceutics*, Springer, p. 386.
- [83] J. Obad, J. Šušković e B. Kos, “Antimicrobial Activity of Ibuprofen: New Perspectives on an “Old” Non-Antibiotic Drug,” *European Journal of Pharmaceutical Sciences* , 2015.
- [84] “Cosmetics- Microbiology- Guidelines for the risk assessment and identification of microbiologically low-risk products,” *International Standard- ISO 29621*, 2010.
- [85] L. Clontz, “Antimicrobial activity and efficacy,” em *Microbial Limit and Bioburden Tests*, 2^a edition, New York, Taylor & Francis Group, 2009, p. 42.

ANEXOS

Anexo A: Resultados das contagens de microrganismos obtidas nas validações dos produtos

Produto: Ibuprofeno Suspensão Oral

Nas tabelas A.1 a A.4 estão representados os resultados obtidos na validação das diluições testadas para cada formulação do Ibuprofeno suspensão oral.

Tabela A.1 - Resultados das contagens microbianas obtidas na validação do produto Ibuprofeno suspensão oral com 100% API e 100% conservante

Produto	Diluição e solvente testados	Microrganismo	Controlo positivo (ufc/ml)	Contagem no produto (ufc/ml)	TR (%)	Resultado
Ibuprofeno suspensão oral: 100%API e 100% conservante	Diluição 1:10 em eugon	<i>E. coli</i>	168	75	44,6	Não Validado
		<i>P. aeruginosa</i>	40	11	27,5	
		<i>S. aureus</i>	121	129	106,6	
		<i>C. albicans</i>	26	23	88,5	
		<i>A. brasiliensis</i>	34	31	91,2	
	Diluição 1:100 em eugon	<i>E. coli</i>	168	98	58,3	<u>Validado</u>
		<i>P. aeruginosa</i>	40	39	97,5	
		<i>S. aureus</i>	121	108	89,3	
		<i>C. albicans</i>	26	22	84,6	
		<i>A. brasiliensis</i>	34	35	102,9	

Tabela A.2- Resultados das contagens microbianas obtidas na validação do produto Ibuprofeno suspensão oral com 100% API e 90% conservante

Produto	Diluição e solvente testados	Microrganismo	Controlo positivo (ufc/ml)	Contagem no produto (ufc/ml)	TR (%)	Resultado
Ibuprofeno suspensão oral: 100%API e 90% conservante	Diluição 1:100 em eugon	<i>E. coli</i>	123	142	115,4	<u>Validado</u>
		<i>P. aeruginosa</i>	40	32	80,0	
		<i>S. aureus</i>	134	121	90,3	
		<i>C. albicans</i>	22	19	86,4	
		<i>A. brasiliensis</i>	37	34	91,9	

Tabela A.3 - Resultados das contagens microbianas obtidas na validação do produto Ibuprofeno suspensão oral com 100% API e 80% conservante

Produto	Diluição e solvente testados	Microrganismo	Controlo positivo (ufc/ml)	Contagem no produto (ufc/ml)	TR (%)	Resultado
Ibuprofeno suspensão oral: 100%API e 80% conservante	Diluição 1:100 em eugon	<i>E. coli</i>	123	133	108,1	<u>Validado</u>
		<i>P. aeruginosa</i>	40	48	120,0	
		<i>S. aureus</i>	134	118	88,1	
		<i>C. albicans</i>	22	22	100,0	
		<i>A. brasiliensis</i>	37	32	86,5	

Tabela A.4 - Resultados das contagens microbianas obtidas na validação do produto Ibuprofeno suspensão oral com 100% API e 50% conservante

Produto	Diluição e solvente testado	Microrganismo	Controlo positivo (ufc/ml)	Contagem no produto (ufc/ml)	TR (%)	Resultado
Ibuprofeno suspensão oral: 100%API e 50% conservante	Diluição 1:10 em Eugon	<i>E. coli</i>	123	26	21,1	Não Validado
		<i>P. aeruginosa</i>	40	10	25,0	
		<i>S. aureus</i>	134	87	64,9	
		<i>C. albicans</i>	22	20	90,9	
		<i>A. brasiliensis</i>	37	31	83,8	
	Diluição 1:100 em Eugon	<i>E. coli</i>	123	133	108,1	<u>Validado</u>
		<i>P. aeruginosa</i>	40	52	130,0	
		<i>S. aureus</i>	134	124	92,5	
		<i>C. albicans</i>	22	21	95,5	
		<i>A. brasiliensis</i>	37	33	89,2	

Produto: Shampoo para a queda do cabelo

Nas tabelas A.5 a A.6 estão representados os resultados obtidos na validação das diluições testadas para as formulações do shampoo com 20% e 10% de álcool, respectivamente.

Tabela A.5 - Resultados das contagens microbianas obtidas na validação do Shampoo com 20% de álcool

Produto	Diluição e solvente testados	Microrganismo	Controlo positivo (ufc/ml)	Contagem ufc/ml de produto	TR (%)	Resultado
Shampoo com 20% álcool	Diluição 1:100 em Euguon	<i>E. coli</i>	157	107	68,2	Validado
		<i>P. aeruginosa</i>	113	111	98,2	
		<i>S. aureus</i>	123	110	89,4	
		<i>C. albicans</i>	20	20	100,0	
		<i>A. brasiliensis</i>	79	79	100,0	
	Diluição 1:1000 em Euguon	<i>E. coli</i>	157	141	89,8	Validado
		<i>P. aeruginosa</i>	113	125	110,6	
		<i>S. aureus</i>	123	147	119,5	
		<i>C. albicans</i>	20	22	110,0	
		<i>A. brasiliensis</i>	79	75	94,9	

Tabela A.6- Resultados das contagens microbianas obtidas na validação do Shampoo com 10% de álcool

Produto	Diluição e solvente testado	Microrganismo	Controlo positivo (ufc/ml)	Contagem ufc/ml de produto	TR (%)	Resultado
Shampoo com 10% álcool	Diluição 1:100 em Euguon	<i>E. coli</i>	157	119	75,8	Validado
		<i>P. aeruginosa</i>	113	117	103,5	
		<i>S. aureus</i>	123	77	62,6	
		<i>C. albicans</i>	20	15	75,0	
		<i>A. brasiliensis</i>	79	69	87,3	

Produto: Suplemento vitamínico

Na tabela A.7 está representado os resultados obtidos na validação da diluição testada para o suplemento vitamínico.

Tabela A.7- Resultados das contagens microbianas obtidas na validação do Suplemento vitamínico

Produto	Diluição e solvente testados	Microrganismo	Controlo positivo (ufc/ml)	Contagem ufc/ml de produto	TR (%)	Resultado
Suplemento vitamínico	Diluição 1:10 em APT	<i>E. coli</i>	80	94	117,5	<u>Validado</u>
		<i>P. aeruginosa</i>	84	91	108,3	
		<i>S. aureus</i>	101	119	117,8	
		<i>C. albicans</i>	91	89	97,8	
		<i>A. brasiliensis</i>	89	80	89,9	

Produto: Paracetamol solução oral

Na tabela A.8 está representado os resultados obtidos na validação da diluição testada para o paracetamol solução oral.

Tabela A.8- Resultados das contagens microbianas obtidas na validação do Paracetamol solução oral

Produto	Diluição e solvente testados	Microrganismo	Controlo positivo (ufc/ml)	Contagem ufc/ml de produto	TR (%)	Resultado
Paracetamol solução oral	Diluição 1:10 em Eugon	<i>E. coli</i>	66	70	106,1	<u>Validado</u>
		<i>P. aeruginosa</i>	69	55	79,7	
		<i>S. aureus</i>	127	111	87,4	
		<i>C. albicans</i>	87	103	118,4	
		<i>A. brasiliensis</i>	43	41	95,4	

Produto: Creme muda fraldas

Na tabela A.9 está representado os resultados obtidos na validação das diluições testadas para o creme muda fraldas.

Tabela A.9- Resultados das contagens microbianas obtidas na validação do Creme muda fraldas

Produto	Diluição e sol- vente testados	Microrganismo	Controlo positivo (ufc/ml)	Contagem ufc/ml de produto	TR (%)	Resultado
Creme muda fraldas	1:10 em Eugon	<i>E. coli</i>	98	8	8,2	Não vali- dado
		<i>P. aeruginosa</i>	85	29	34,1	
		<i>S. aureus</i>	120	135	112,5	
		<i>C. albicans</i>	23	11	47,8	
		<i>A. brasiliensis</i>	37	7	18,9	
	1:100 em Eugon	<i>E. coli</i>	157	117	74,5	<u>Validado</u>
		<i>P. aeruginosa</i>	123	88	71,5	
		<i>S. aureus</i>	113	90	79,6	
		<i>C. albicans</i>	20	17	85,0	
		<i>A. brasiliensis</i>	79	83	105,1	

Produto: Pomada de Óxido de Zinco

Na tabela A.10 está representado os resultados obtidos na validação da diluição testada e do agente emulsio-
nante utilizado para a pomada de óxido de zinco.

Tabela A.10- Resultados das contagens microbianas obtidas na validação da Pomada de Óxido de Zinco

Produto	Agente emul- sionante,dilui- ção e solvente testados	Microrganismo	Controlo positivo (ufc/ml)	Contagem ufc/ml de produto	TR (%)	Resultado
Pomada de Óxido de Zinco	Adição de 200 µl de miristato de isopropilo + Diluição 1:100 em Eugon	<i>E. coli</i>	88	87	98,9	<u>Validado</u>
		<i>P. aeruginosa</i>	124	91	73,4	
		<i>S. aureus</i>	115	86	74,8	
		<i>C. albicans</i>	78	86	110,3	
		<i>A. brasiliensis</i>	63	61	96,8	